

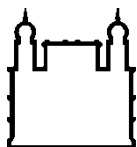
**MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACTATO POR CÉLULAS DE  
SCHWANN INFECTADAS PELO *Mycobacterium leprae* E SUA  
IMPLICAÇÃO NA NEUROPATIA HANSÊNICA**

**KARINA GIRARDI DO CARMO DE VASCONCELOS**

**RIO DE JANEIRO  
Setembro de 2016**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*KARINA GIRARDI DO CARMO DE VASCONCELOS*

Modulação da Produção de Lactato por Células de Schwann Infectadas pelo *Mycobacterium leprae* e sua Implicação na Neuropatia Hansênica

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Celular e Molecular

**Orientadores:** Prof. Dr. Flávio Alves Lara  
Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

**RIO DE JANEIRO**

Setembro de 2016

Vasconcelos, Karina Girardi do Carmo de.

Modulação da produção de lactato por células de Schwann infectadas pelo *Mycobacterium leprae* e sua implicação na neuropatia hansênica / Karina Girardi do Carmo de Vasconcelos. - Rio de Janeiro, 2016.  
81 f.; il.

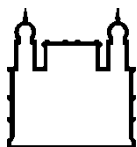
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2016.

Orientador: Flávio Alves Lara.

Co-orientadora: Maria Cristina Vidal Pessolani .

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Hanseníase. 2. Metabolismo Schwann. 3. Dano neural. I. Título.



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***AUTORA: KARINA GIRARDI DO CARMO DE VASCONCELOS***

**MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACTATO POR CÉLULAS DE SCHWANN  
INFECTADAS PELO *Mycobacterium leprae* E SUA IMPLICAÇÃO NA NEUROPATIA  
HANSÊNICA**

**ORIENTADORES:** Prof. Dr. Flávio Alves Lara  
Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

**Aprovada em: 8 / 09 / 2017**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dra. Clarissa Maya Monteiro-**Revisora**  
Prof. Dr. Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto-**Presidente**  
Prof. Dr. Mauro Sola-Penna-**Membro**  
Prof. Dr. Sérgio Luiz Gomes Antunes-**Membro**  
Prof. Dr. Danuza de Almeida Esquenazi-**Suplente**  
Prof. Dra. Cristiana Santos de Macedo-**Suplente**

Rio de Janeiro, 8 de setembro de 2016

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao Flávio Alves Lara por toda a orientação, acompanhando desde a iniciação científica todos os meus erros e evoluções neste período, sempre com ideias novas, desafios e puxões de orelha quando necessários. Rychelle C. Affonso Medeiros, mestre e agora doutoranda que me treinou desde cultura de células e quando eu não sabia nem como segurar uma pipeta, me ajudando incontáveis vezes, partilhando não somente seu conhecimento científico, mas também suas histórias, risadas, humor e algumas vezes o esquecimento de objetos. Agradeço ao Bruno S. Mietto, por toda a ajuda nos experimentos, com muito capricho nas culturas de neurônios, buscando o melhor, além do seu entusiasmo e positividade. À Dra Cristina Pessolani, sempre disposta a explicar e ajudar à todos através de sua experiência e conhecimento.

À minha Família vocês me apoiaram demais e sempre estiveram ao meu lado nos momentos complicados que passei e também naqueles mais alegres, em especial à Aline Girardi, Ricardo, Thales Medeiros, Carol Affonso, Matheus Rodrigues e Amanda.

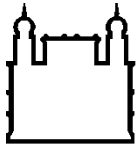
Aos meus grandes amigos Sabrina Alves e Arthur Neumann, pelo companheirismo mútuo que temos desde a graduação, por toda a parceria, desabafo, conselhos, ajuda e amizade que vão além da vida acadêmica. Ao João Pedro Santos, por todos os quebra galhos encontrando materiais e ajuda à todos no laboratório, à Fernanda Luz com quem tive a oportunidade de passar o que aprendi com a Rychelle, muito obrigada pelo companheirismo e alegria entre experimentos. Agradeço também à Letícia Lery, sempre muito atenciosa e esclarecedora de muitas dúvidas que tive e, que com certeza ainda terei ao longo da metabolômica.

Agradeço a todos os integrantes da equipe lamichel: Débora, Chyntia, Fabrício, Thabatta, Sueyde, Diego, Fernanda Marques, Camila Oliveira, Larissa, Tiago Gomes, Marcia Berredo, Cristiana Macedo, Juliana Menara, Talyta, Luísa Gutierrez, Plínio, Antônio Marcos, Robertha Lemes, Melissa, Victor Barbosa, Mayara de Mattos, Natasha e também aos agregados que sempre estão conosco tornando o laboratório muito mais agradável, Jéssica musa, Priscila Ellen rainha do mundo fitness, Thiago Pinto, Leonardo e André sejam nos turnos da noite, manha ou tarde.

Por fim, agradeço a toda à banca examinadora, pela contribuição e discussão do projeto desenvolvido.

*“A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em  
procurar novas paisagens, mas em ter novos olhos”*

*Marcel Proust*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

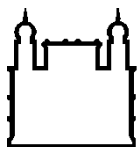
### MODULAÇÃO DA PRODUÇÃO DE LACTATO POR CÉLULAS DE SCHWANN INFECTADAS PELO *Mycobacterium leprae* E SUA IMPLICAÇÃO NA NEUROPATIA HANSÊNICA

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**Karina Girardi do Carmo de Vasconcelos**

A hanseníase caracteriza-se como uma doença infectocontagiosa crônica, com grande potencial incapacitante, cujo agente etiológico é o *Mycobacterium leprae*. O bacilo é a única bactéria conhecida capaz de infectar o sistema nervoso periférico, afetando principalmente macrófagos e células de Schwann, gerando desmielinização segmentar e perda axonal. Acredita-se até o momento que a lesão do nervo é resultado da infecção do *M. leprae* ao parênquima neural, o que gera recrutamento de células polimorfonucleares e subsequente neurite. Muito tem se estudado sobre o metabolismo de células gliais no sistema nervoso central e, nos últimos anos, no sistema nervoso periférico. O lactato é um produto da glicólise anaeróbia e desempenha um papel importante no metabolismo axonal, sendo exportado pelas células de Schwann para os axônios através de transportadores específicos, onde é então metabolizado, representando a principal fonte de energia axonal. No presente estudo, foi observada a redução de liberação de lactato por células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* e, apesar desta redução, as células infectadas superexpressaram os transportadores de monocarboxilatos (MCT). Além disso, a adição dos sobrenadantes de células de Schwann infectadas em culturas de neurônios primários demonstrou visível efeito neurotóxico. Através do uso do 6-ANAM, inibidor específico da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), principal enzima da via das pentoses fosfato, constatamos que a liberação de lactato por células de Schwann infectadas é restaurada e a viabilidade do *M. leprae* diminui. Análises preliminares do fluxo de carbono demonstraram grande incorporação de carbono oriundo da via das pentoses fosfato em aminoácidos essenciais em células infectadas pelo bacilo. Por fim, a inibição da via das pentoses reverteu parcialmente o efeito neurotóxico presente nos meios condicionados por células de Schwann infectadas. Assim, a modulação do metabolismo energético da célula hospedeira pode representar um novo mecanismo de insulto axonal relacionado à infecção pelo *M. leprae*, sendo a via das pentoses fosfato uma rota extremamente importante para a viabilidade do bacilo, e por esse motivo, um alvo em potencial para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas para o controle da Hanseníase e da neuropatia associada a esta doença.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### THE HOST-CELL FERMENTATIVE METABOLISM MODULATION DURING *Mycobacterium leprae* INFECTION AND THIS INVOLVEMENT IN LEPROSY NEUROPATHY

#### ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY

**Karina Girardi do Carmo de Vasconcelos**

Leprosy is characterized as a chronic infectious contagious disease with disabling potential, the etiologic agent of which is *Mycobacterium leprae*. The bacillus is the only bacterium capable of infecting the peripheral nervous system, mainly affecting macrophages and Schwann cells, generating segmental demyelination and axonal loss. Until now, the nerve damage is a result of *M. leprae* infection to the neural parenchyma, which leads to recruitment of polymorphonuclear cells and subsequent neuritis. Research in recent years has suggested that lactate from glial cells may be crucial for supporting axonal function. Lactate is a product of anaerobic glycolysis and plays an important role in axonal metabolism, being exported by the Schwann cells to the axons through specific transporters, where it's then metabolized, representing the main source of axonal energy. In the present study, the reduction of lactate release by *M. leprae*-infected Schwann cells was observed and, despite this reduction, infected cells overexpressed monocarboxylate (MCT) transporters. In addition, addition of infected Schwann cell supernatants in cultures of primary neurons demonstrated a visible neurotoxic effect. Through the use of 6-ANAM, a specific inhibitor of glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD), the main enzyme in the pentoses phosphate pathway, we found that lactate release by infected Schwann cells is restored and the viability of *M. leprae* decrease. Preliminary analyzes of the carbon flux have shown great incorporation of carbon from the phosphate pentose pathway into essential amino acids in cells infected by the bacillus. Finally, inhibition of the pentoses pathway partially reversed the neurotoxic effect present in media conditioned by infected Schwann cells. Thus, modulation of energy metabolism of the host cell may represent a new mechanism of axonal insult related to *M. leprae* infection, the phosphate pentoses pathway being an extremely important route for the viability of the bacillus, and therefore, a target in Potential for the development of new therapeutic tools for the control of leprosy and neuropathy associated with this disease.



## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>x</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
1. Hanseníase.....	15
1.1 considerações gerais.....	15
1.2 Agente etiológico.....	16
1.3 Epidemiologia .....	19
1.4 Formas clínicas, diagnóstico e tratamento .....	22
2. Metabolismo energético.....	24
2.1 Principais rotas de oxidação da glicose .....	24
2.2 Biossíntese de aminoácidos em mamíferos .....	27
3. Nervo periférico.....	29
3.1 Anatomia do nervo periférico.....	31
3.2 Lesão neural na hanseníase.....	32
3.3 Metabolismo das células de Schwann e interações com o axônio	
<b>4. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>37</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
5.1 Objetivo geral .....	39
5.2 Objetivos específicos .....	39
<b>6. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
6.1 Linhagem de células de Schwann.....	
6.2 Obtenção dos explantes, dissociação e manutenção de cultura de células primárias.....	41
6.3 Obtenção do <i>Mycobacterium leprae</i> .....	41
6.4 Análise da liberação de ácido láctico nos sobrenadantes durante a infecção .....	42
6.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio usando	
6.6 DHE.....	42
6.7 Análise da expressão gênica de proteínas-chave no metabolismo e fermentativo e viabilidade do <i>Mycobacterium leprae</i> .....	43
6.8 Imunocitoquímica de neurônios primários.....	43
6.9 Análise dos destinos do carbono nas células de Schwann infectadas.	
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>46</b>
7.1 Modulação do metabolismo fermentativo em células de Schwann infectadas pelo <i>M. leprae</i> .....	46
7.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em células	

de Schwann infectadas pelo M. leprae .....	48
7.3 Análise da concentração de lactato após a inibição da via das pentoses fosfato .....	50
7.4 Viabilidade de Mycobacterium leprae com o uso do 6ANAM, inibidor da via das pentoses fosfato .....	51
7.5 Adição de sobrenadantes de células de Schwann infectadas em neurônios .....	52
7.6 Análise do fluxo de carbono de células infectadas e do M. leprae....	54
<b>8. DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>9. CONCLUSÃO .....</b>	<b>69</b>
<b>10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>71</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.2</b> Morfologia do <i>Mycobacterium leprae</i> .....	16
<b>Figura 1.2.1</b> Cultivo de <i>M. leprae</i> na pata de camundongo.....	17
<b>Figura 1.2.3</b> Diferenças entre os genomas do <i>M. leprae</i> e <i>M. tuberculosis</i> .....	19
<b>Figura 1.3.1</b> Taxa de prevalência de Hanseníase reportada à Organização mundial da saúde (OMS) referente ao ano de 2014.....	19
<b>Figura 1.3.2</b> Percentual de casos de hanseníase no Brasil avaliados quanto ao grau de incapacidade no diagnóstico e na cura de 2001 a 2014.....	20
<b>Figura 1.3.3</b> Coeficiente de Detecção de Hanseníase por município.....	21
<b>Figura 1.3.4</b> Coeficiente de detecção geral de casos novos de hanseníase Brasil e estados.....	22
<b>Figura 1.4</b> Formas clínicas da Hanseníase.....	23
<b>Figura 2.1</b> Reação catalisada pelo complexo lactato desidrogenase .....	25
<b>Figura 2.1.2</b> Esquema da via das pentoses fosfato.....	27
<b>Figura 2.2</b> Esquema geral das vias metabólicas discutidas e suas moléculas precursoras de aminoácidos.....	28
<b>Figura 3.1</b> Representação da estrutura do nervo periférico.....	31
<b>Figura 3.2</b> Danos aos nervos em pacientes com hanseníase.....	32
<b>Figura 3.3</b> Esquema demonstrando o suporte metabólico oferecido pelas células gliais ao axônio.....	35
<b>Figura 7.1</b> Análise da concentração de lactato no sobrenadante de células de Schwann.....	46
<b>Figura 7.2</b> Análise da concentração de lactato no sobrenadante em células de Schwann expostas a frações do <i>M. leprae</i> .....	47
<b>Figura 7.3</b> Expressão relativa dos transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2 e MCT4 em células de Schwann infectadas .....	48
<b>Figura 7.4.</b> Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio durante a infecção e diferentes estímulos.....	49
<b>Figura 7.5</b> Análise da concentração de lactato no sobrenadante de células de Schwann infectadas tratadas com 6ANAM .....	50

<b>Figura 7.6</b> Viabilidade celular através quantificação da enzima LDH no sobrenadante de células de Schwann da linhagem ST8814.....	51
<b>Figura 7.7</b> Viabilidade intracelular do <i>M. leprae</i> após tratamento com o inibidores da via das pentoses (6anam) e glutatona(BSO).....	52
<b>Figura 7.8</b> Análises de neurônios primários após a adição de sobrenadantes de células de Schwann.....	53
<b>Figura 7.9</b> Análise da incorporação de <sup>13</sup> C em alanina em células de Schwann e <i>M. leprae</i> expostos a D-glicose- <sup>13</sup> C6.....	55
<b>Figura 7.10</b> Análise da incorporação de <sup>13</sup> C em serina em células de Schwann e <i>M. leprae</i> expostos a D-glicose- <sup>13</sup> C6.....	55
<b>Figura 7.11</b> Análise da incorporação de <sup>13</sup> C em asparagina em células de Schwann e <i>M. leprae</i> expostos a D-glicose- <sup>13</sup> C6.....	57
<b>Figura 7.12</b> Análise da incorporação de <sup>13</sup> C em lisina de células de Schwann e <i>M. leprae</i> expostos a D-glicose- <sup>13</sup> C6.....	58
<b>Figura 7.13</b> Análise da incorporação de <sup>13</sup> C em Treonina de células de Schwann e <i>M. leprae</i> expostos a D-glicose- <sup>13</sup> C6.....	58
<b>Figura 7.14</b> Análise da incorporação de <sup>13</sup> C em glutamina de células de Schwann controles e infectadas por <i>M. leprae</i> expostos a D-glicose- <sup>13</sup> C6.....	59
<b>Figura 7.14</b> Análise da incorporação de <sup>13</sup> C em glutamina de células de Schwann controles e infectadas por <i>M. leprae</i> expostos a D-glicose- <sup>13</sup> C6.....	60
<b>Figura 7.16</b> Análise da incorporação de <sup>13</sup> C em fenilalanina e tirosina em células de Schwann controles e infectadas expostas a D-glicose- <sup>13</sup> C6.....	61

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Aminoácidos nutricionalmente essenciais e não essenciais em mamíferos.....	29
---	----

## LISTA DE SIGLAS E AREVIATURAS

<b>2-NBDG</b>	2[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-
2-deoxy-d- glucose	
<b>6-ANAM</b>	6-aminonicotinamida
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BAAR</b>	Bacilo álcool resistente
<b>BB</b>	Borderline borderline
<b>BSO</b>	Butionina sulfoximina
<b>BSA</b>	Albumina bovina sérica
<b>BL</b>	Borderline lepromatoso
<b>BT</b>	Borderline tuberculoide
<b>CoA</b>	Coenzima A
<b>DHE</b>	Dihydroethidium
<b>DMSO</b>	Dimethyl sulfoxide
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>ERK</b>	Quinase regulada pela sinalização extracelular
<b>FAD</b>	Dinucleotídeo de flavina e adenina
<b>GLUT</b>	Transportador de glicose
<b>G6PD</b>	Glicose 6-fosfato desidrogenase
<b>HCL</b>	Ácido clorídrico
<b>IGF-1</b>	Fator semelhante à insulina1
<b>LDH</b>	Lactato desidrogenase
<b>LL</b>	Lepromatoso
<b>MB</b>	Multibacilar
<b>Mb</b>	Mega pares de base
<b>MCT</b>	Transportador de monocarboxilatos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MOI</b>	Multiplicidade da infecção
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>NADPH</b>	Dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato

<b>NGF</b>	Fator de crescimento nervoso
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PB</b>	Paucibacilar
<b>PDIM</b>	Fticerol dimicocerosato
<b>PGL-1</b>	Glicolípídeo fenólico 1
<b>PQT</b>	Poliquimioterapia
<b>qRT-PCR</b>	RT- PCR quantitativo( em tempo real)
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>RPM</b>	Rotações por minuto
<b>SBF</b>	Soro fetal bovino
<b>TMRM</b>	<i>Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester</i>

## **INTRODUÇÃO**

## 1. Hanseníase

### 1.1 Considerações gerais

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa, de caráter sistêmico, causada pelo *Mycobacterium leprae*. Sinais e sintomas dermatoneurológicos, tal como a perda de sensibilidade caracterizam a doença.<sup>1</sup> Esta patologia afeta o homem há milhares de anos e, dessa forma, é conhecida como uma das doenças mais antigas descritas.

No Egito antigo, há relatos da hanseníase em hieróglifos de 1350 a.C. Na Bíblia também há trechos com o termo “lepra” nos capítulos 13 e 14 do Levítico. Este termo o qual era designado à doença perdurou por muito tempo. No entanto, de acordo com Omoprolla (1981) a palavra lepra também foi utilizada para designar outras doenças dermatológicas, tornando-se incerto o período exato do aparecimento da doença. Por muito tempo os indivíduos doentes foram vistos como amaldiçoados e pecadores, sendo marginalizados da sociedade devido a este pensamento.<sup>2,3</sup>

O aparecimento da Hanseníase no Brasil deu-se após a chegada dos colonizadores portugueses, relatando-se os primeiros casos no ano de 1600, no Rio de Janeiro. Somente em 1873, houve a identificação do *Mycobacterium leprae*, descoberta feita pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen, através da presença de estruturas em formas de bastões em amostras de nódulos de pacientes com Hanseníase, por meio de análise microscópica.<sup>4,5</sup> A partir desta descoberta, o indivíduo doente passou a ser considerado a fonte de dispersão de bacilos. Em 1920 foi criado no Brasil o departamento nacional de saúde pública e, com isso, formulou-se a inspetoria de profilaxia da lepra e doenças venéreas, dois séculos após do surgimento dos primeiros casos da doença no país. O objetivo foi estabelecer medidas para o controle da doença, por meio da construção de leprosários.<sup>6,7</sup>

Todavia, percebeu-se que o impacto social era enorme devido a segregação dos indivíduos doentes. Dessa maneira, medidas mais brandas foram adotadas e, somente em 1954 foi extinta a internação compulsória dos indivíduos doentes em leprosários.<sup>8,9</sup>

A partir da década de 60, houve a gradual mudança do termo lepra para hanseníase, buscando afastar o histórico de estigma e preconceitos, no Brasil esta troca ocorreu em 1976.<sup>10</sup>

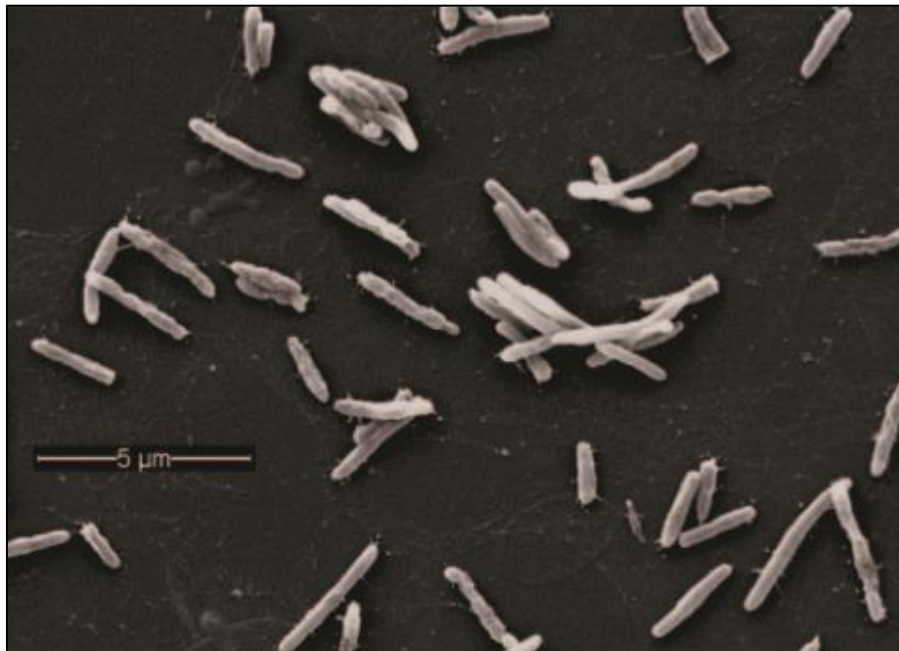
Atualmente a forma de transmissão da doença não está totalmente estabelecida, sabe-se através do contato prolongado com indivíduos doentes e que a disseminação do *M. leprae* ocorra por meio da inalação de aerossóis ou, ainda, pelo contato cutâneo direto com secreções



respiratórias ou feridas.<sup>11</sup> O homem não é o único hospedeiro do bacilo, na década de 70 foram relatados nos Estados Unidos tatus naturalmente infectados.<sup>12</sup> Além disso, no sul dos Estados Unidos, alguns pacientes apresentaram a mesma cepa de *M. leprae* a aquela encontrada em tatus selvagens, sugerindo que estes poderiam ser uma importante fonte para a dispersão de *M. leprae*.<sup>13</sup> Recentemente foi visto, em ensaios *in vitro*, que *M. leprae* permanece vivo no trato intestinal de *Rhodnius prolixus* e que este triatomíneo secreta o bacilo viável nas fezes. No entanto ainda não foi comprovado que este dado represente mais um mecanismo de transmissão.<sup>14</sup>

## 1.2 Agente etiológico

O *Mycobacterium leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, células de Schwann e macrófagos são as células hospedeiras preferencialmente infectadas pelo bacilo. Morfologicamente é reto e levemente encurvado nas extremidades, conforme é possível observar na figura 1.2.1.



**Figura 1.2.1** Morfologia do *Mycobacterium leprae*. A imagem feita a partir de microscopia eletrônica de varredura elucida a superfície do bacilo. Retirado de Scollard et al (2006)<sup>1</sup>

O bacilo tem aproximadamente de 1 a 8  $\mu\text{m}$  de comprimento e 0,3  $\mu\text{m}$  de diâmetro, não possui plasmídeos e é imóvel. A reprodução é lenta, com duração de aproximadamente 11-13 dias, através do processo de divisão binária.<sup>1,15</sup> O bacilo possui membrana plasmática, parede

celular e uma camada mais externa, denominada cápsula. A parede celular do *M. leprae* tem cerca de 20nm de espessura, composta por peptidoglicanos ligados covalentemente aos ácidos arabinogalactano micólicos. Na cápsula encontram-se diversos lipídeos, glicolípido fenólico-1(PGL-1) e o Ftiocerol dimicocerosato (PDIM) destacam-se por serem observados unicamente em *M. leprae*.<sup>16,17,18</sup>

Após a sua caracterização como bactéria causadora da hanseníase e diante da impossibilidade de cultivo *in vitro*, houve a tentativa de cultivar o bacilo em modelos animais. Tatus e camundongos atímicos foram os únicos animais que obtiveram sucesso nestas tentativas. Dessa maneira, em 1960 Charles Shepard demonstrou a multiplicação de *M. leprae* em patas de camundongos, com isso novas oportunidades para a investigação sobre a patologia e sua interação com mecanismos imunológicos do hospedeiro surgiram.<sup>19</sup>

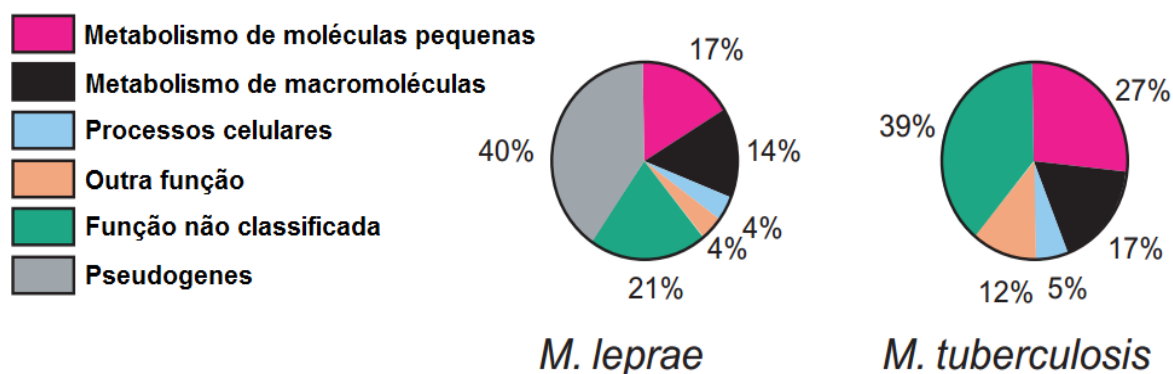


**1.2.2 Cultivo de *M. leprae* na pata de camundongo.** Fonte: Scollard et al (2006).<sup>1</sup>

Atualmente, os camundongos utilizados para a multiplicação dos bacilos são os nu/atímicos e devido a isso carecem de células B e T, representando este o modelo mais utilizado para obtenção de bacilos por diversos grupos de pesquisa em inoculações *in vitro*.<sup>19</sup> Conforme mostrado na figura 1.2.2, no local onde foi inoculado o *M. leprae*, denominado coxim plantar, observa-se o intenso crescimento de bacilos, atingindo cerca de  $10^9$  ou mais bacilos por pata. *M. leprae* tem predileção por temperaturas mais frias, essa característica também reflete a aparição das lesões na pele, mucosa nasal e nervos periféricos. Assim, a incubação a 37°C reduz sua viabilidade, mas se armazenado em meio de cultura a 33°C, pode ser mantido viável por cerca de uma semana.<sup>20,21</sup> É considerado organismo Gram-positivo e

álcool ácido resistente a partir do método de coloração de Zeihl-Neelsen, onde uma vez corado pela fucsina, o bacilo não é descorado por uma solução álcool-ácida, mantendo-se com coloração rósea.<sup>22,23</sup>

A partir do sequenciamento do genoma do *M. leprae* foi possível compreender pouco mais a cerca da sua natureza intracelular. Interessantemente, foi observado que ao longo da evolução o bacilo sofreu um processo de redução evolutiva do seu genoma. Conforme observado por Cole e colaboradores (2001), aproximadamente metade do genoma do *M. leprae* é composto por pseudogenes que foram aparentemente conservados, porém desprovidos de função aparente.<sup>24</sup> Contudo, estudos em micobactérias e em outros organismos têm sugerido que algumas dessas regiões não codificantes transcritas desempenham algum papel na regulação de genes funcionais, patogênese ou no parasitismo intracelular.<sup>25,26</sup>



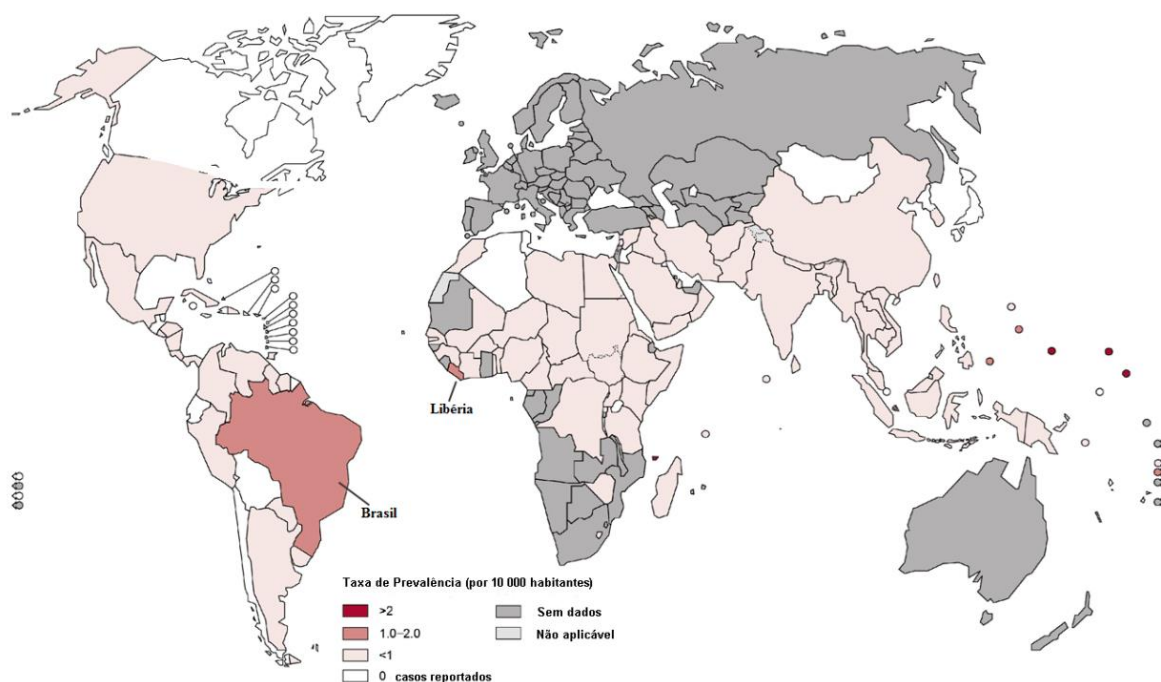
**Figura 1.2.3** Diferenças entre os genomas do *M.leprae* e *M. tuberculosis*. Destaca-se no *M.leprae* a grande região correspondente a pseudogenes e de funções desconhecidas. Fonte: Vissa V.D e Brennan P. J (2001).

Conforme visto na figura acima, Vissa e Brennan (2001) ilustraram as diferenças entre os genomas do *M. leprae* e *M. tuberculosis*, que é a micobactéria mais próxima geneticamente do bacilo de Hansen.<sup>27</sup> Desse modo, através da comparação entre os genomas é possível observar a redução do genoma do *M. leprae*. Interessantemente, o percentual de pseudogenes corresponde a 40% do genoma.<sup>24</sup> Em relação às vias anabólicas e catabólicas, aparentemente as vias anabólicas mantiveram-se mais conservadas. Contudo, foi observado redução do repertório genético necessário para a realização de catabolismo.<sup>24</sup> Desse modo, não é totalmente compreendido a forma pela qual o *M. leprae* obtém energia de seu hospedeiro, pois ocorreu a perda de muitos genes associados à captação de fontes de carbono. A grande maioria das micobactérias intracelulares obtém energia através da degradação de lipídios do hospedeiro, as lipases são enzimas que iniciam este processo, catalisando a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol. O bacilo tem apenas 2 genes codificantes para

lipase (*lipG* e *lipU*), a enzima málica está ausente e há apenas uma isocitrato liase, além da incapacidade de gerar ATP através da oxidação de NADH. Todos os genes relacionados com o metabolismo do acetato encontram-se inativos. Ainda conforme Cole e colaboradores (2001), o genoma do *M. leprae* contém todos os genes do ciclo do glioxilato, o que permitiria que o organismo utilizasse acetil-coenzima A, a partir de  $\beta$ -oxidação de lipídios e parte do sistema de captação de ferro parece funcional.<sup>24</sup> Todas estas restrições citadas implicam no crescimento a partir do uso de poucas de fontes de carbono e reflitam na dificuldade do cultivo do bacilo em meios artificiais.

### 1.3 Epidemiologia

Conforme observado na figura abaixo (figura 1.3.1), é possível observar o mapa da dispersão de prevalência da hanseníase no mundo. Países desenvolvidos são pouco afetados pela doença, em contraste estão às regiões marcadas, correspondentes a países em desenvolvimento como o Brasil e extrema pobreza como a Libéria.

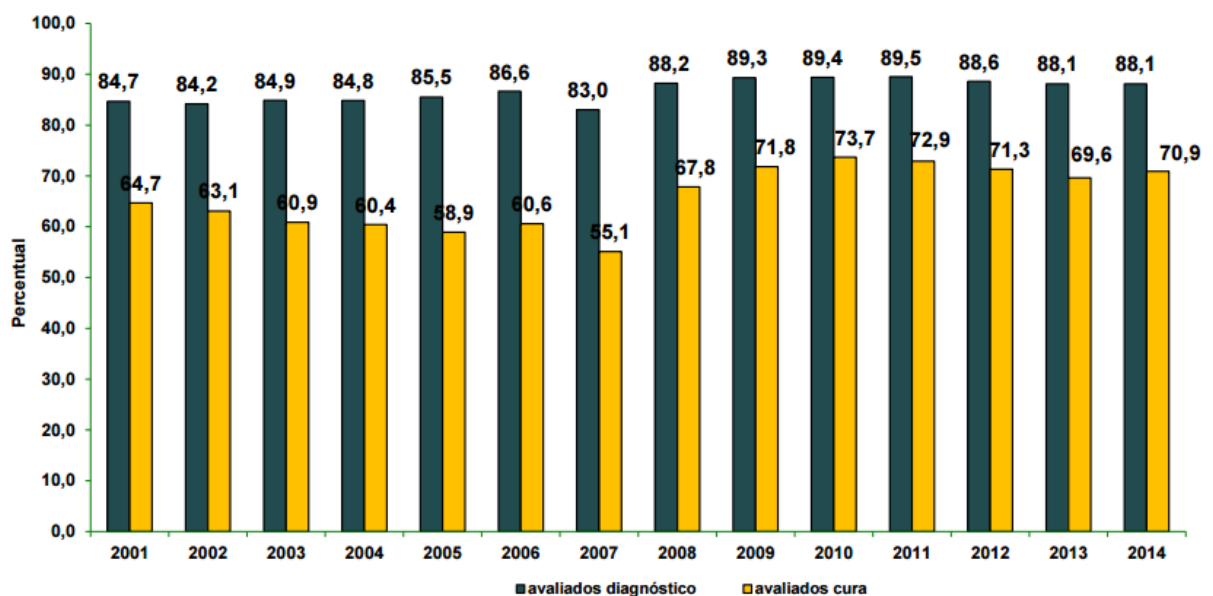


**Figura 1.3.1 Taxa de prevalência de Hanseníase reportada à Organização mundial da saúde (OMS) referente ao ano de 2014.** A taxa de prevalência corresponde a cada 10.000 habitantes. Os países em destaque representam o Brasil (América do Sul) e a Libéria (África). Fonte: Organização Mundial da Saúde (2015)<sup>28</sup>

A hanseníase faz parte do grande grupo de doenças negligenciadas, as quais despertam pouco interesse de iniciativas privadas. Em 2014, Brasil e Libéria destacaram-se na taxa de

prevalência (casos em registro) da doença, neste mesmo ano foi relatado o aumento do número de casos na população infantil, indicando a transmissão ativa na população. Embora no mapa de prevalência (figura 1.3.1) a Índia não esteja destacada com o índice alto de prevalência, este país foi responsável por 125.785 casos novos da doença em 2014. Brasil e Indonésia seguiram atrás com 31.064 e 17.025, respectivamente. Juntos, estes três países foram responsáveis por 81% dos novos casos de hanseníase no mundo em 2014.<sup>28</sup>

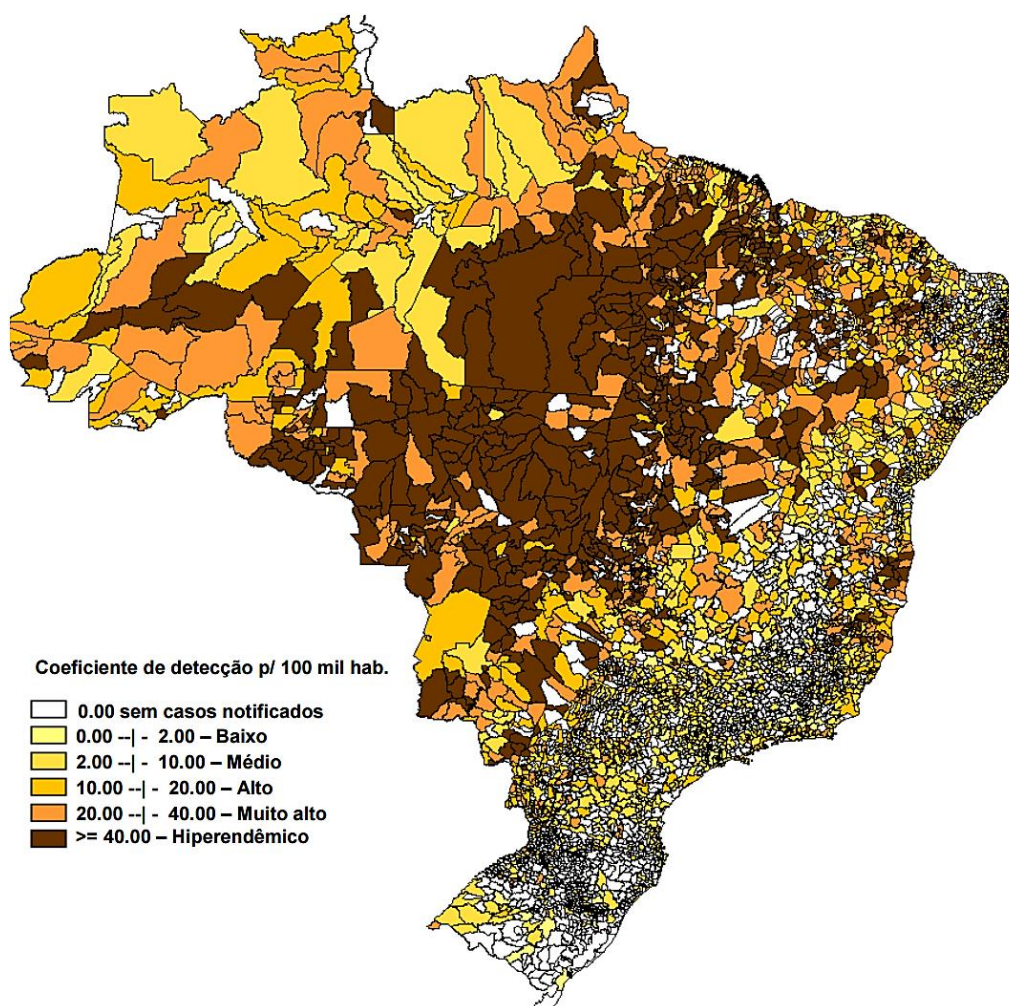
Outro aspecto preocupante é o número de casos de indivíduos com presença de incapacidade e deformidades ocasionadas pela doença. No Brasil, foram registrados 2.034 em 2014, indicando a incapacidade do sistema único de saúde (SUS) em estabelecer protocolos de diagnóstico precoce em todo o território nacional.<sup>28</sup>



**Figura 1.3.2 Percentual de casos de hanseníase no Brasil avaliados quanto ao grau de incapacidade no diagnóstico e na cura no período de 2001 a 2014.** Há uma pequena variação do percentual de incapacidade antes e após do diagnóstico, indicando o dano permanente nesta população de pacientes avaliados. Fonte: Ministério da saúde (2015).<sup>29</sup>

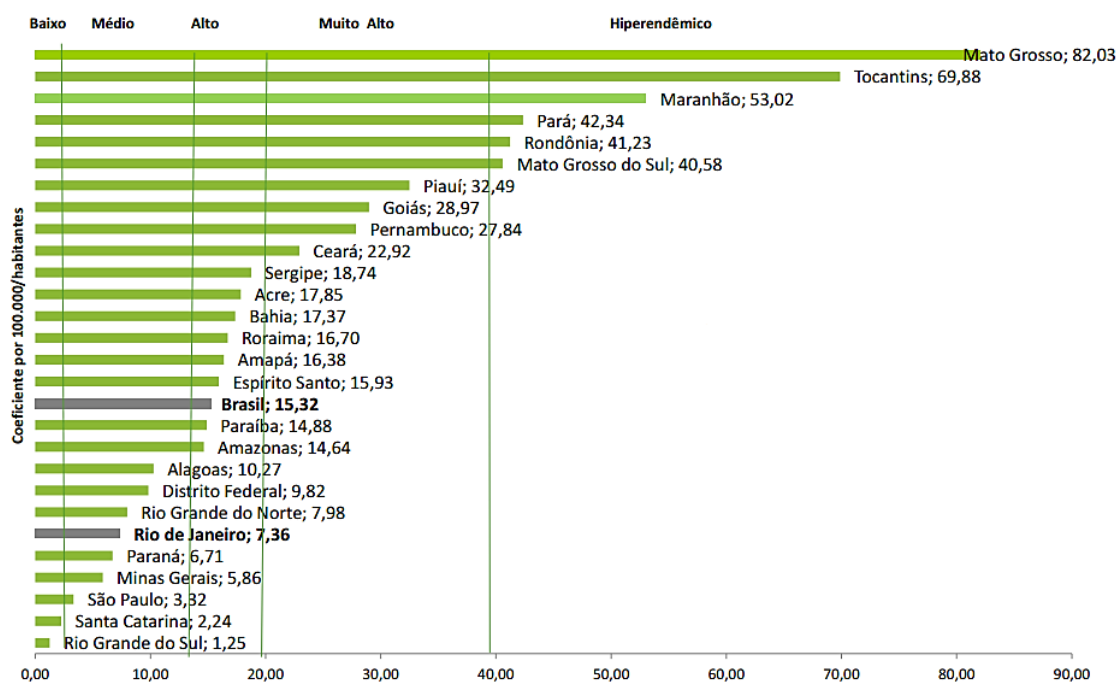
Conforme visto na figura 1.3.2, incapacidades físicas ocasionadas pela doença podem permanecer após o final do tratamento de acordo com o levantamento de casos feito pelo ministério da saúde em 2015.

No Brasil encontra-se uma enorme diferença da detecção de hanseníase entre regiões, que vão desde virtual erradicação a regiões hiperendêmicas, conforme visto na figura 1.3.3 e figura 1.3.4.



**1.3.3 Coeficiente de Detecção de Hanseníase por município.** As regiões centro-oeste e norte do país apresentam coeficientes de detecção considerado muito alto e /ou hiperendêmico. Em contraste, na região sul em geral possui baixa detecção. Fonte: Ministério da saúde (2015).<sup>29</sup>

A diferença no coeficiente de detecção entre os estados Brasileiros torna-se mais evidente abaixo (Figura 1.3.4). Estados do norte e nordeste do país apresentam índices extremamente elevados. Mato grosso, Tocantins, Maranhão, Pará, Rondônia e Mato Grosso do Sul são os estados em situação mais crítica, considerados hiperendêmicos para hanseníase.



**Figura 1.3.4 Coeficiente de detecção geral de casos novos de hanseníase Brasil e estados.** A média do Brasil é considerada alta. Além disso, é possível observar a enorme diferença da detecção de casos novos por estados. Fonte: Ministério da saúde (2015).<sup>29</sup>

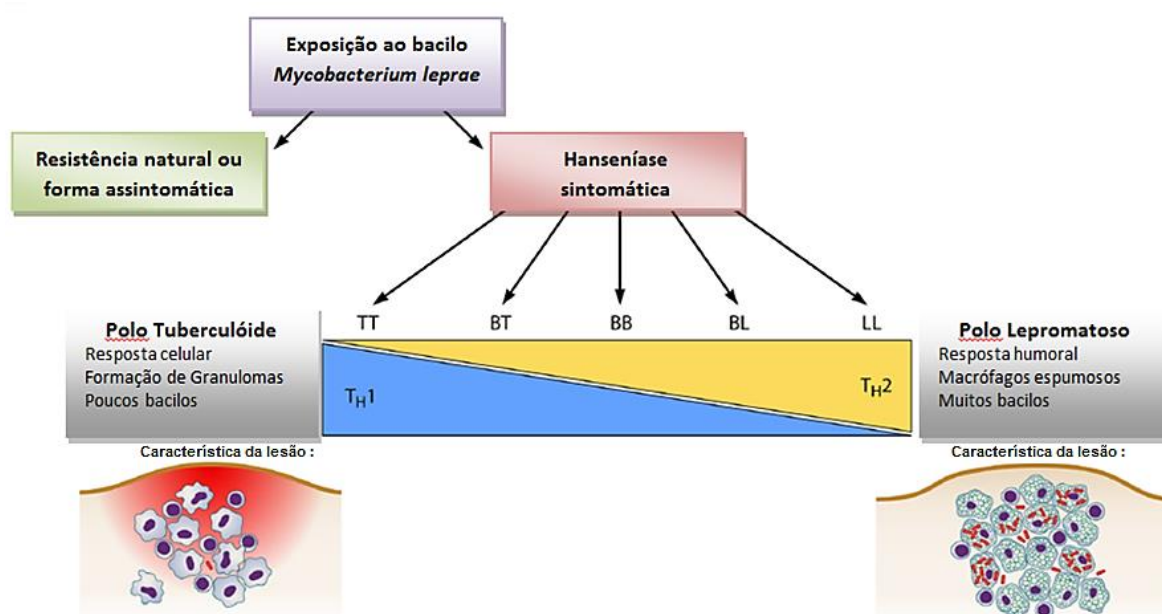
## 1.4 Formas clínicas, diagnóstico e tratamento

A hanseníase pode afetar indivíduos de todas as faixas etárias e não há predileção entre os sexos. Estima-se que 95% da população adulta tenha imunidade natural contra o *M.leprae*.<sup>30</sup> A doença apresenta diferentes formas clínicas, separadas por apresentarem características diversas, cujo desenvolvimento de cada uma delas é dependente de mecanismos imunológicos do hospedeiro.<sup>31</sup> Sabe-se que fatores genéticos estão relacionados com a susceptibilidade do hospedeiro, uma vez que diferentes polimorfismos genéticos foram encontrados em pacientes com hanseníase, dentre eles no gene PARK2 e citocinas como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  foram relatados.<sup>32,33,34,35</sup>

Em 1966, Ridley & Jopling adotaram a classificação de subgrupos, obedecendo a critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos. Assim, o indivíduo afetado pode apresentar um espectro de manifestações que varia entre as formas tuberculóide-tuberculóide (TT) e a lepromatosa-lepromatosa (LL).<sup>31</sup> O polo tuberculóide caracteriza-se pela presença de poucas lesões na pele, no entanto, bem definidas. Onde raramente detectam-se bacilos em biópsias de pele, pois a resposta imune do hospedeiro é eficaz contra o bacilo. Neste polo, ocorre forte resposta imunológica do tipo Th1 anti-*Mycobacterium leprae*.

Em contrapartida, o polo lepromatoso caracteriza-se pelo aparecimento de numerosas lesões no corpo, com presença abundante de bacilos nos nervos bem como em outras partes do corpo e há o predomínio da resposta celular Th2, além da exacerbação de resposta humoral.<sup>31</sup>

Entre os polos TT e LL existem formas clínicas mais instáveis, são elas: *borderline-tuberculoide*(BT), *borderline-borderline*(BB) e *borderline-lepromatoso*(BL). As características destas formas seguem de acordo com a proximidade entre as formas LL e TT, como observado na figura 1.4.



**Figura 1.4 Formas clínicas da Hanseníase.** O indivíduo exposto ao *M. leprae* pode apresentar resistência natural ou permanecer assintomático. Os indivíduos que desenvolvem a doença podem apresentar diferentes formas clínicas com características distintas. O polo tuberculóide (TT), há formação de granulomas, presença de poucos bacilos e resposta imune celular. O outro polo chamado lepromatoso (LL), há presença de macrófagos espumosos, presença de muitos bacilos e resposta imune humoral. Entre essas formas, existem as formas *borderlines* (BT, BB e BL), caracterizadas pelas proximidades entre os polos. Fonte: Adaptado Misch et al. (2010)<sup>36</sup>

De modo a organizar a distribuição de medicamentos entre as formas clínicas, em 1982 a organização mundial da saúde (OMS) agrupou as formas clínicas TT, BT classificando-as em paucibacilares e as formas clínicas LL, BT, BB em multibacilares.<sup>37</sup>

Além das formas clínicas citadas acima, os pacientes podem desenvolver episódios inflamatórios agudos, chamados de episódios reacionais. Existem dois tipos de reações hansênicas, a reação do tipo I, também conhecida como reação reversa e a reação do tipo II,



conhecida como eritema nodoso hansênico.<sup>38</sup> A natureza acerca dos mecanismos que levam o início destes episódios ainda não foi totalmente compreendida.

O diagnóstico da Hanseníase é feito a partir da observação de sinais característicos, como a falta de sensibilidade em lesões cutâneas e o espessamento do calibre de nervos periféricos. Para a confirmação do resultado, testes mais sensíveis podem ser feitos como a baciloscopia da linha (BAAR), teste de Mitsuda e o histopatológico.<sup>39,40,41</sup> Recentemente vem crescendo a utilização de ensaios moleculares baseados na técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), a partir de amostras clínicas como sangue, secreção nasal, bucal, fragmentos de pele e de nervos,<sup>42</sup> no entanto, a utilização da PCR ainda permanece distante da realidade dos postos de saúde espalhados pelo país. Atualmente, estudos vêm sendo feitos a fim de novas possibilidades de diagnóstico. Oliveira e colaboradores, por exemplo, identificaram em biópsias de pacientes com hanseníase fosfatidilserina e glicosilceramida como possíveis marcadores lipídicos para a doença.<sup>43</sup>

Não há nenhuma forma de prevenção específica contra hanseníase. No entanto, o ministério da saúde indica a vacinação para tuberculose, pois esta vacina chamada BGC apresentou evidências da atenuação da hanseníase.<sup>44,45</sup> Apesar da falta de um mecanismo de prevenção direto para a doença, o tratamento existe e o diagnóstico precoce é fundamental para a resolução da doença. O tratamento indicado pelo Ministério da Saúde se baseia na administração de 3 medicamentos, constituindo a poliquimioterapia (PQT), são eles a rifampicina, dapsona e clofazimina. O tratamento é longo e sua duração varia entre os polos da doença, o acompanhamento do indivíduo doente é essencial, já que podem ocorrer efeitos colaterais.<sup>44</sup>

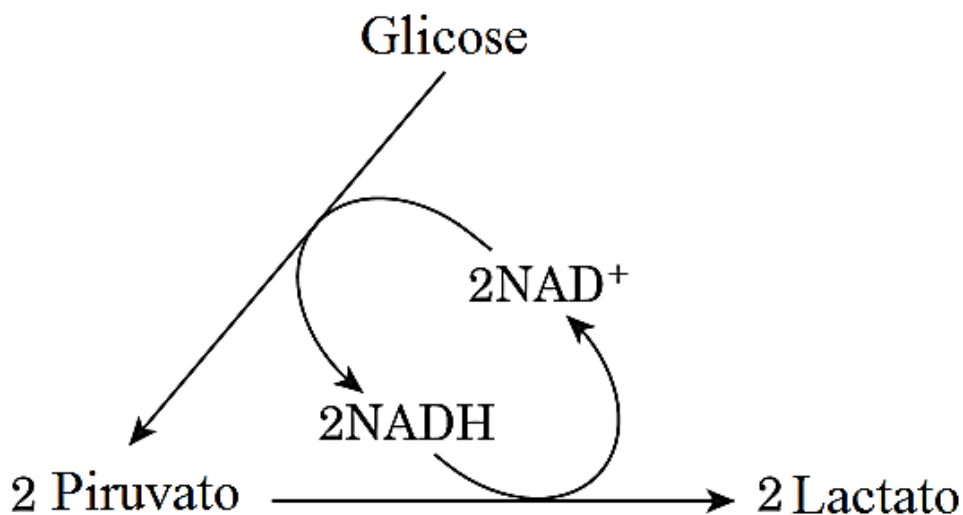
## **2. Metabolismo energético**

### **2.1 Principais rotas de oxidação da glicose**

A glicose é uma das principais fontes de energia em diversos organismos. Quando as demandas energéticas aumentam, ela é liberada dos polímeros de glicogênio, sua forma de armazenamento intracelular e, então é empregada para produção de ATP de maneira aeróbica ou anaeróbica. A quebra da molécula de glicose e sua transformação em duas moléculas de piruvato é denominada glicólise. Durante esta via, parte da energia liberada é conservada na forma de ATP e NADH. O piruvato formado pode seguir três destinos de acordo com o estado metabólico do organismo ou tecido.<sup>46</sup>

Sob condições aeróbias, o piruvato formado a partir da glicólise sofre ação do complexo enzimático piruvato desidrogenase, gerando a partir desta reação acetil-CoA, CO<sub>2</sub> e NADH. O acetil-CoA gerado é condensado com uma molécula de oxaloacetato formando citrato, o qual sofre sucessivas oxidações no chamado ciclo de Krebs, na mitocôndria. A cada ciclo ocorre a formação das moléculas reduzidas NADH e FADH<sub>2</sub>, que posteriormente serão utilizadas como fonte de poder redutor pelos complexos transportadores de prótons na cadeia respiratória mitocondrial na chamada fosforilação oxidativa, gerando ATP.<sup>46</sup>

Em condições anaeróbias, o NADH gerado pela glicólise não consegue ser reoxidado pela fosforilação oxidativa, devido à ausência do aceptor final de elétrons dessa cadeia, o O<sub>2</sub>. A incapacidade de regenerar o NADH em NAD<sup>+</sup> deixaria a célula sem receptor de elétrons para a oxidação do gliceraldeído 3-fosfato e as reações liberadoras de energia da glicose seriam interrompidas. Com isso, o NAD<sup>+</sup> é regenerado através de outro processo, por meio da formação de lactato.<sup>46</sup>



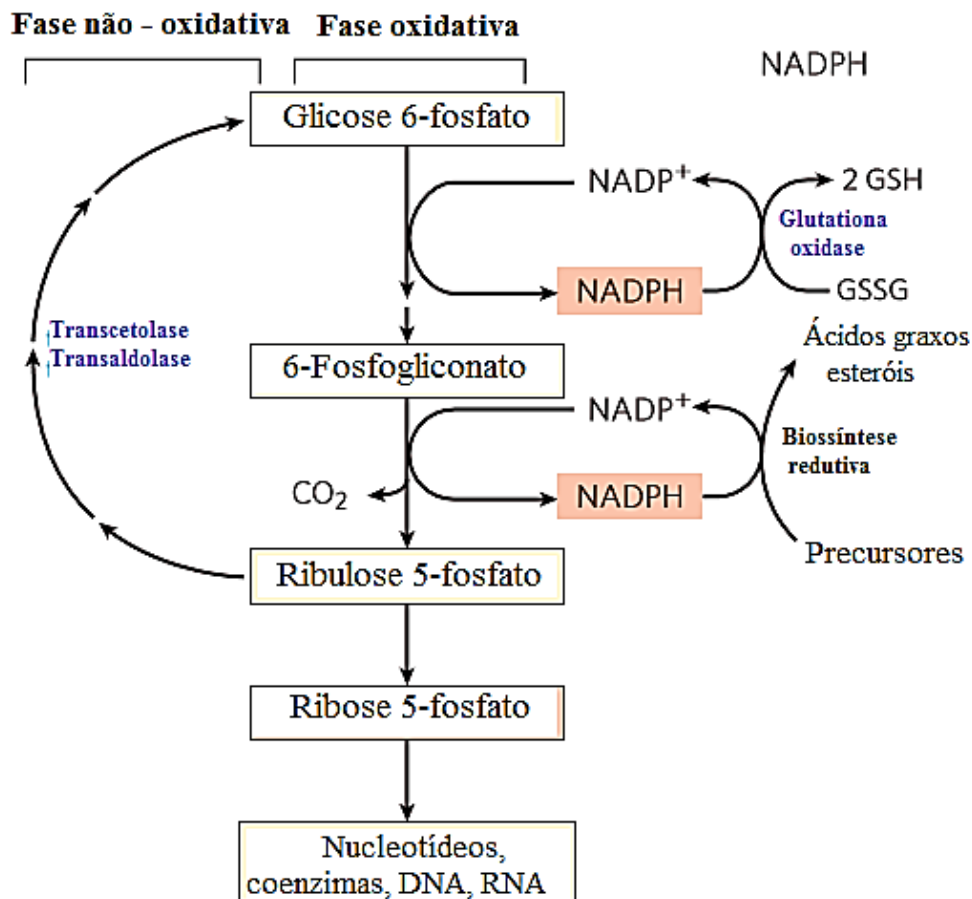
**Figura 2.1 Reação catalisada pelo complexo lactato desidrogenase.** A cada molécula de glicose são gerados a partir da glicólise duas moléculas de piruvato, que sob condições de baixa oxigenação ou demanda metabólica intensa, se reduzirá em duas moléculas de lactato. A partir da redução do piruvato a lactato, NAD<sup>+</sup> é formado, fazendo com que a glicólise continue ocorrendo. Fonte: Adaptado Nelson e Cox (2011)<sup>46</sup>

A redução do piruvato a lactato forma NADH que por sua vez regenera o NAD<sup>+</sup> (figura 2.1). Essa reação é catalisada pela enzima lactato desidrogenase. Esta enzima é composta por 4 subunidades de dois tipos distintos denominados H (*Heart*) e M (*Muscle*) por conta da sua expressão predominantemente no coração e no músculo, respectivamente. O lactato é hidrofílico e não se difunde através da membrana plasmática, existem, portanto transportadores específicos, denominados MCTs (transportadores de monocarboxilatos) que

carreiam o lactato e também grupos cetoácidos. Foram identificadas 14 isoformas destes transportadores no organismo humano.<sup>47,48</sup>

Atualmente, sabe-se que certos tipos celulares fazem fermentação mesmo sob condições de normoxia. A partir disso, novos papéis estão sendo atribuídos ao lactato. A produção deste metabólito é finamente regulada em nossas células, e seu aumento controla negativamente a atividade da enzima chave da glicólise, a fosfofrutoquinase (PFK) e com isso todo o metabolismo celular, funcionando dessa forma como molécula sinalizadora.<sup>49,50</sup>

Apesar da glicólise ser uma via central para o metabolismo, existem outras vias de oxidação da glicose 6-fosfato que também são fundamentais para as células bem como a via das pentoses fosfato. Conforme mostrado na figura 2.1.2 esta via leva à produção de ribose 5-fosfato, precursor de nucleotídeos e coenzimas.



**Figura 2.1.2 Esquema da via das pentoses fosfato.** A via das pentoses fosfato é dividida entre as fases oxidativa, na qual ocorre a biossíntese redutora importante para processos celulares como o sistema glutathione e biossíntese lipídica e a fase não oxidativa, onde são recicladas seis moléculas de pentoses em cinco moléculas de glicose 6-fosfato. Esta conversão permite que a produção de NADPH permaneça contínua. Fonte: Adaptado de Nelson e Cox (2011).<sup>46</sup>

Esta via oxidativa é extremamente importante em células em divisão, tais como da pele e mucosa intestinal, isso devido a produção de nucleotídeos e coenzimas gerados através desta via. Além disso, a maior parte do NADPH formado pelas células é gerado a partir da primeira reação da via das pentoses fosfato, através da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase.

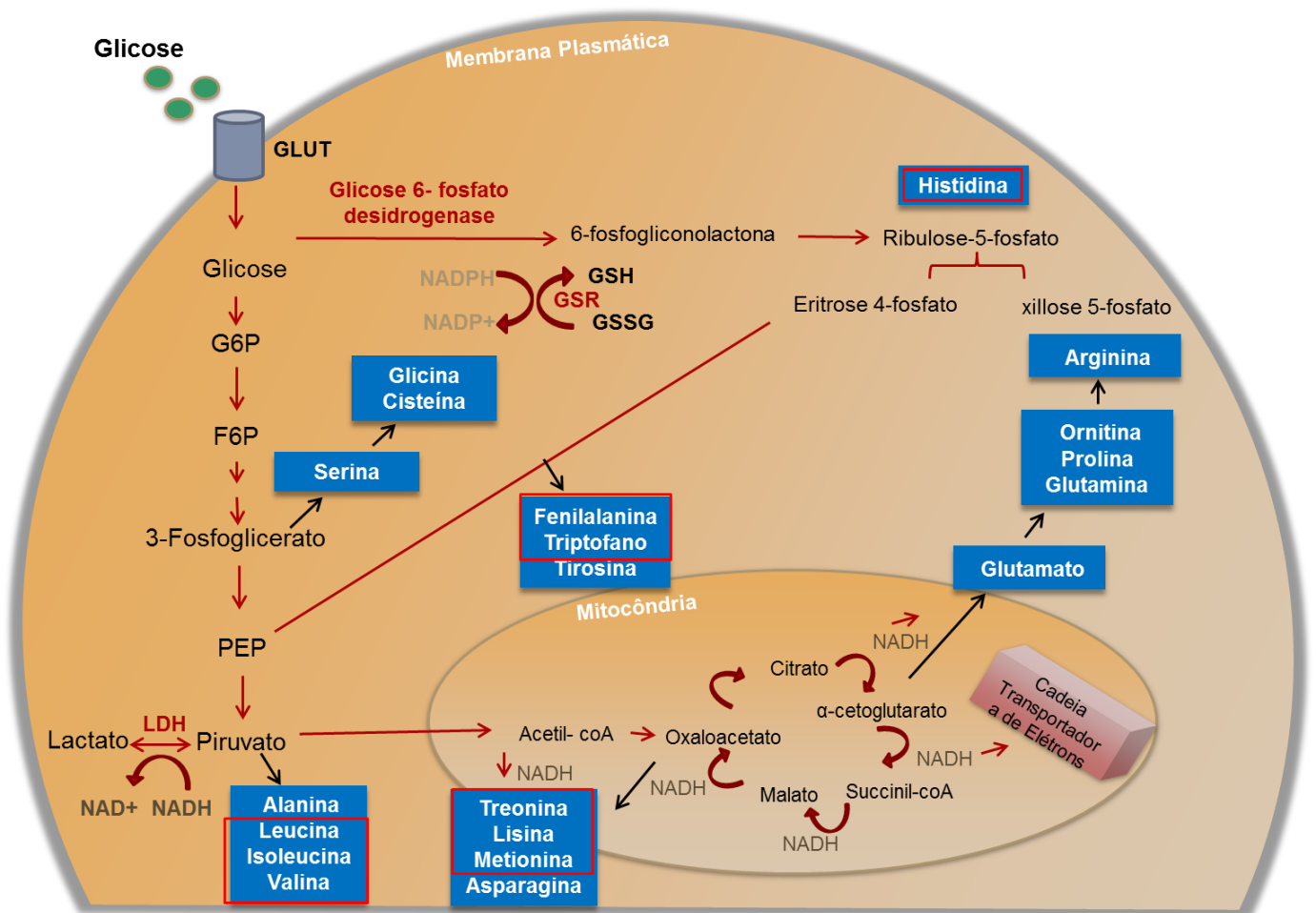
O NADPH pode ser utilizado em diversas vias anabólicas como as reduções de síntese de ácidos graxos e esteróis ou no combate a espécies reativas de oxigênio (ROS), como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical peróxido ( $O_2$ ).

Classicamente, a via é dividida entre as fases oxidativa e não-oxidativa. Na fase oxidativa são formados NADPH e ribose 5-fosfato, utilizada como molécula precursora de nucleotídeos e coenzimas. A fase não-oxidativa recicla moléculas de ribose 5-fosfato que não estão sendo utilizadas pelas células, convertendo-as em glicose 6-fosfato.<sup>46,51</sup>

Espécies reativas de oxigênio podem ser geradas a todo o momento em organismos, através do vazamento de elétrons da cadeia respiratória reduzindo o  $O_2$  ânion superóxido, molécula altamente reativa.<sup>46</sup> Sistemas antioxidantes celulares são importantes para contornar a formação destas moléculas, a glutathiona (GSH) é o principal sistema de defesa celular contra o estresse oxidativo. A ativação deste sistema depende do NADPH. O NADPH faz com que a glutathiona oxidada (GSSG) seja convertida a glutathiona reduzida (GSH), sendo esta forma uma importante molécula antioxidante.<sup>46</sup> O esquema simplificado da via das pentoses fosfato pode ser observado na figura 2.1.2.

## **2.2 Biossíntese de aminoácidos em mamíferos**

Alguns das vias citadas acima possuem moléculas precursoras de aminoácidos. Estruturalmente, os aminoácidos são formados por um grupo amino primário ( $NH_2$ ) ligado covalentemente ao carbono  $\alpha$ , que por sua vez está ligado ao grupo carboxílico ( $COO^-$ ). Além disso, todos os aminoácidos possuem a cadeia lateral, o que distingue os diferentes aminoácidos encontrados na natureza. Os aminoácidos não são somente necessários para a formação de proteínas, mas também são importantes são precursores de neurotransmissores, hormônios entre outros.<sup>51</sup> O ciclo dos ácidos tricarboxílicos é fonte de diversas moléculas precursoras de aminoácidos, conforme é possível observar na figura 2.2.



**Figura 2.2** Esquema geral das vias metabólicas discutidas e suas moléculas precursoras de aminoácidos. Os aminoácidos circulados em vermelho são considerados essenciais em células de mamíferos, enquanto os não circulados são sintetizados pela maquinaria celular. Fonte: Adaptado de Buchakijan e Kornbluth (2010).<sup>52</sup>

Dos aminoácidos serina e glutamato são derivados outros aminoácidos como cisteína e prolina, respectivamente. Outras vias também são fontes para moléculas precursoras de aminoácidos, dentre elas, a glicólise e a via das pentoses fosfato. Os animais mamíferos utilizam 20 aminoácidos para formarem os peptídeos e as proteínas que são essenciais para as funções celulares, no entanto, apenas 11 destes são sintetizados em mamíferos. Outros 9 aminoácidos devem ser ingeridos na alimentação e, devido a isto, são classificados como aminoácidos nutricionalmente essenciais.<sup>53</sup>

**Tabela 1. Aminoácidos nutricionalmente essenciais e não essenciais em mamíferos**

Aminoácidos	
Essenciais	Não-essenciais
Fenilalanina	Ácido aspártico
Histidina	Ácido Glutâmico
Isoleucina	Alanina
Lisina	Glicina
Metionina	Arginina
Treonina	Cisteína
Triptofano	Glutamina
Valina	Prolina
Leucina	Serina
	Tirosina
	Asparagina

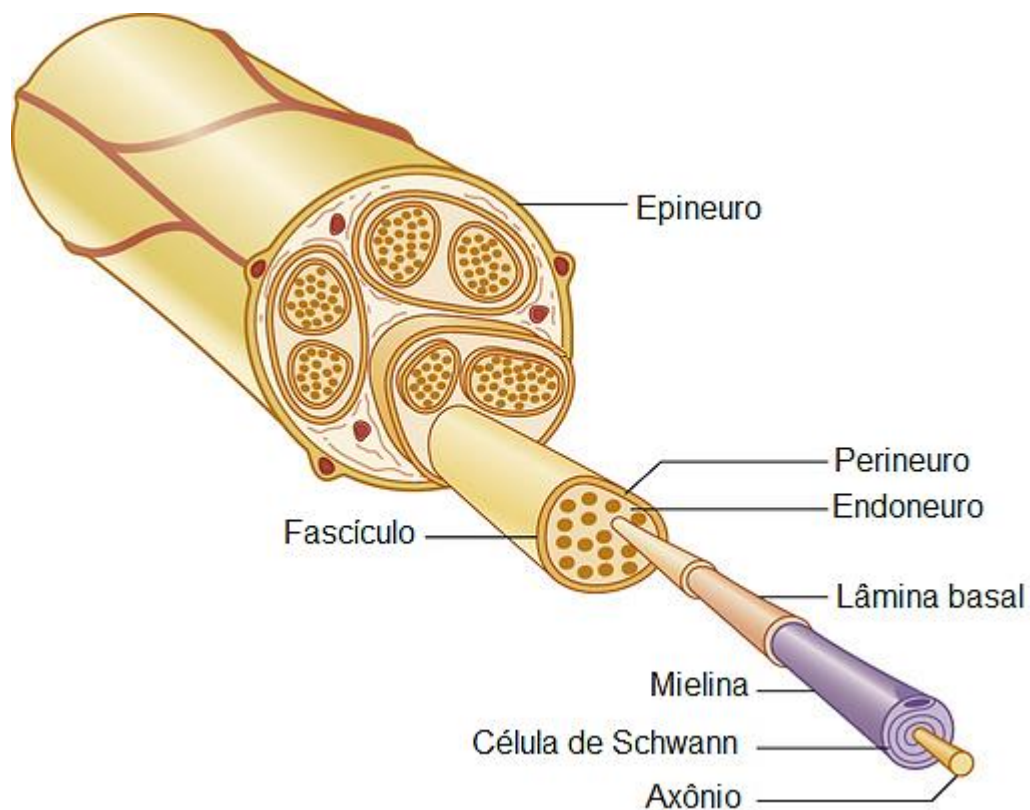
Fonte: Adaptado de Wu  
(2009)<sup>54</sup>

Na tabela 1 é possível observar o conjunto de aminoácidos requeridos na alimentação e os que são formados naturalmente nos organismos de mamíferos. Ao contrário do observado em mamíferos, diversas bactérias e plantas sintetizam todos os 20 aminoácidos comuns.

### **3. Nervos periféricos**

#### **3.1. Anatomia do nervo periférico**

O sistema nervoso é classicamente subdividido em sistema nervoso central e sistema nervoso periférico. A transmissão de informações do cérebro até regiões distantes do corpo são propagadas através de potenciais elétricos também chamados de potenciais de ação. A grande rede arborizada e complexa que conduz as informações até os locais distantes é chamada de sistema nervoso periférico. Por sua vez, o sistema nervoso periférico é dividido em sistema nervoso somático, o qual fornece impulsos motores aos músculos esqueléticos e sistema nervoso autônomo, fornece impulsos motores aos músculos cardíacos, liso e ao epitélio glandular. Os órgãos do sistema nervoso periférico são os nervos e os gânglios.<sup>55</sup>



**Figura 3.1 Representação da estrutura do nervo periférico.** De forma geral, o nervo é composto por camadas de tecido conjuntivo chamadas de epineuro, perineuro e endoneuro. O citoplasma de células de Schwann forma a bainha de mielina em torno dos axônios. Fonte: Neligan, P.C.e Chang, J. (2013).

Existem nervos cranianos e espinais, os quais se estendem do sistema nervoso central aos órgãos periféricos.<sup>55</sup>

O nervo periférico é compartimentalizado em camadas de tecido conjuntivo, chamadas epineuro, perineuro e endoneuro. O epineuro é a camada mais externa, formado por tecido conjuntivo frouxo, delimitando a estrutura do nervo. O perineuro é uma bainha fibrosa, lamelar e densa que envolve as fibras nervosas. Por fim, a camada de tecido conjuntivo chamada de endoneural reveste um conjunto variado de fibras nervosas em fascículos. Cada fascículo, por sua vez, é constituído por axônios mielínicos e amielínicos, A estrutura tubular do endoneuro protege a nutrição das fibras nervosas.<sup>55,56</sup> Axônios chamados de mielínicos apresentam um espesso enovelamento oriundo do citoplasma da célula de Schwann, denominado de bainha de mielina, já os amielínicos não são recobertos por mielina. Atualmente, tem se discutido outras funções atribuídas a bainha de mielina, além da facilitação do impulso nervoso.

As células Schwann são dispostas de modo regular ao longo do eixo axonal, formando espaços intervalados, chamados de nodos de Ranvier, os quais são fundamentais para a rápida propagação do impulso elétrico por apresentarem níveis elevados de canais de  $\text{Na}^+$ .<sup>57,58</sup> Os nervos periféricos são alimentados por artérias que entram no tronco nervoso procedentes de vasos sanguíneos vizinhos, conforme mostrado na figura 3.1.

### 3.2 Lesão neural na Hanseníase

A visualização de bacilos em nervos é um fator marcador de hanseníase, uma vez que entre diversos patógenos, a infecção dos nervos periféricos é uma propriedade única do *M. leprae*. A neuropatia hanseníase pode ocorrer em qualquer forma clínica (TT, BT, BB, BL e LL) e independente da ocorrência de episódios reacionais. A redução do calibre axonal é bem descrita nos pacientes com hanseníase, pode-se desenvolver anestesia, paralisia e, em casos onde o indivíduo é diagnosticado tardiamente, potenciais deformidades incapacitantes nos dedos das mãos, pés e até mesmo dano ocular. Na figura 3.2 é possível observar alguns dos danos neurais em pacientes com hanseníase.<sup>59,60</sup>



**Figura 3.2 Danos aos nervos em pacientes com hanseníase.** Em A e B nervos visivelmente dilatados. Em C, dano irreversível. Fonte: A. Colin McDougall.<sup>60</sup>



Embora a anestesia local seja uma consequência séria e bem conhecida da hanseníase, evidências relataram que um grande número de pacientes apresentaram dor neuropática, mesmo após o fim do tratamento com a poliquimioterapia.<sup>61</sup> Alguns ensaios têm sido feitos para avaliar as bases moleculares no dano neural, porém a incapacidade cultivo do bacilo *in vitro* diminui, assim como a inexistência de um bom modelo de estudo da neuropatia hanseníase, diminui os avanços sobre a compreensão desta patologia.

Inicialmente, acreditava-se que o *M. leprae* se ligava à célula de Schwann da derme exposta e, em seguida, movia-se proximalmente dentro do nervo.<sup>62</sup> No entanto, estudos recentes em nervos periféricos de tatus infectados experimentalmente demonstraram que o bacilo infecta os nervos de fora para dentro. De acordo com Scollard (2015) o bacilo se acumula primeiramente no sistema linfático epineural e assim atinge os vasos sanguíneos que irrigam o epineuro. O processo inflamatório local observado nas lesões cutâneas atinge então os nervos subcutâneos e posteriormente os troncos nervosos.<sup>63</sup> Dentro do fascículo, o *M. leprae* é internalizado por células de Schwann mielínicas ou amielínicas. A predileção da infecção pelo bacilo em células de Schwann amielínicas ainda não foi completamente esclarecido. O bacilo é bem adaptado em parasitar células de Schwann, nenhum efeito morfológico é observado na infecção *in vitro* nestas células.

Os mecanismos pelos quais ocorrem à entrada do *M. leprae* em células de Schwann foram demonstrados em alguns trabalhos. Sabe-se que o bacilo se liga através do glicolípido fenólico-1 (PGL-1) interagindo com o domínio globular da cadeia  $\alpha 2$  da laminina 2 presentes nas células de Schwann.<sup>64,65,66</sup> Segundo Rambukkana e colaboradores, o bacilo é capaz de se ligar e ativar o receptor de tirosina quinase ErbB2, o que induz a via de transdução de sinal envolvendo Erk1/2 levando à reprogramação das células de Schwann a um perfil desdiferenciado, representando esta a principal fonte da lesão neural até o momento elucidada.<sup>67</sup> Estudos concentram-se na identificação de fatores inflamatórios como possíveis causadores dos danos observados. Foi identificada em lesões de nervos de pacientes borderlines tuberculóides (BL) a presença de nitrotirosina, um metabólito do óxido nítrico. Interessantemente, esta molécula foi associada com a peroxidação de lipídios da bainha de mielina em outras neuropatias, sugerindo a utilização de lipídeos da bainha de mielina pelo *M. leprae*.<sup>68,69</sup> Até o momento não foi totalmente compreendido a contribuição da infecção pelo *M. leprae* nas células de Schwann e o meio inflamatório local na patogênese neural da doença. Possivelmente o dano neural não ocorre somente através de uma via, como citocinas

presentes no meio inflamatório nas lesões, mas sim de um conjunto de fatores que não estão bem esclarecidos.

### 3.3 Metabolismo das células de Schwann e interações com o axônio

Poucos estudos se concentram na compreensão das fontes energéticas e alterações no metabolismo energético das células de Schwann que a infecção possa acarretar. Sabe-se que a infecção induz a formação de corpúsculos lipídicos, e que estes são recrutados para fagossomos contendo o *M. leprae* em macrófagos e células de Schwann,<sup>70</sup> representando uma potencial fonte de energia. Contudo, foi visto que mesmo com a intensa incorporação de colesterol, o bacilo o converte a colestenoína, porém não consegue metabolizar os anéis de esterol ou a cadeia lateral do colesterol, sendo portanto incapaz de utilizá-los como fonte de carbono.<sup>71</sup>

Em paralelo com o presente trabalho, foram observadas alterações no metabolismo de células de Schwann da linhagem ST8814 durante a infecção pelo *Mycobacterium leprae*, dentre elas, o aumento de captação de glicose, visto através da utilização do análogo fluorescente 2-NBDG. Diante da importância das células de Schwann na hanseníase, investigou-se também a atividade mitocondrial utilizando o fluoróforo TMRM (*Tetramethyl Rhodamine Methyl Ester*), marcador seletivo do potencial da membrana mitocondrial, e foi observado que a infecção reduz o potencial de ação mitocondrial das células hospedeiras. Dados ainda não publicados demonstraram o aumento da expressão da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) em células infectadas, fragmentos de lesão de pele e nervos de pacientes do polo multibacilar.<sup>72</sup> Esta enzima catalisa a primeira reação da via das pentoses fosfato, gerando ribulose 5P 6-fosfogluconato e NADPH. O NADPH por sua vez regenera o sistema glutatona, importante via responsável pelo combate de espécies reativas de oxigênio e síntese de proteínas no Complexo de Golgi.

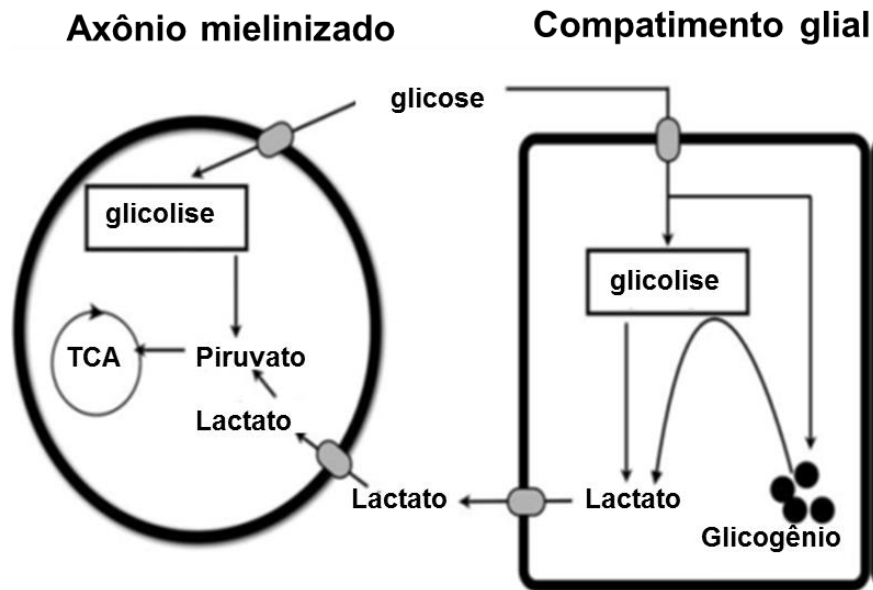
As células da glia foram observadas pela primeira vez pelo patologista Rudolf Virchow em 1846, descritas como substâncias macias e de natureza frágil, contrastando com o tecido fibroso dos neurônios, sendo aparentemente os componentes que ligavam os neurônios. Durante as últimas décadas as células gliais foram caracterizadas como componentes celulares ativos no funcionamento e patologias do sistema nervoso.<sup>73</sup> As interações neurônio-glia controlam diversos processos do desenvolvimento do sistema nervoso, tais como neuritogênese, formação de sinapses, diferenciação neuronal e remoção de restos celulares.<sup>74</sup>

No sistema nervoso central, o importante papel das células gliais no metabolismo neuronal foi bem caracterizado. A atividade neuronal é fortemente ligada ao metabolismo dos astrócitos e a liberação de lactato, uma que vez que os astrócitos aumentam sua atividade glicolítica em resposta a um aumento do glutamato extracelular.<sup>75,76</sup>

Além disso, em situações de baixa glicolítica ou atividade neuronal intensa, o lactato liberado dos astrócitos para os neurônios mostrou-se importante para manutenção da função neuronal e também em funções de formação de memória.<sup>77</sup> Doenças neurodegenerativas que não estavam inicialmente associadas com a deficiência de energia estão sendo agora caracterizadas, como a disfunção do metabolismo de oligodendrócitos recentemente ligado a esclerose amiotrófica lateral.<sup>78</sup>

O transporte de lactato e piruvato dentro dos complexos celulares é feito através de transportadores de monocarboxilados (MCTs), em oligodendrocitos foi identificado MCT1 com afinidade por lactato.<sup>79</sup> Além disso, em outras células como astrócitos e neurônios também foram identificados tais transportadores,<sup>80,81,82</sup> indicando a importância metabólica do lactato nestas células. O lactato também tem sido relacionado como molécula sinalizadora no cérebro, através do receptor de ácido hidrocarboxílico (HCAR1), descrito por Mosienko e colaboradores (2015) em neurônios do hipocampo, córtex e cerebelo.<sup>83</sup> Estudos recentes indicam que a bainha de mielina atua no suporte energético ao axônio. Ravera e colaboradores (2013) observaram enzimas do ciclo glicolítico e de Krebs funcionalmente expressas na bainha de mielina.<sup>84</sup> Além disso também foi visto a presença de conexinas entre a bainha de mielina e o citoplasma dos axônios.<sup>85</sup>, sugerindo uma possível maneira de transferir ATP da bainha ao axônio.

No sistema nervoso periférico, Angus e colaboradores demonstraram que a célula de Schwann é capaz de armazenar glicogênio, visto através da presença da enzima glicogênio fosforilase co-localizando com glicogênio no citoplasma das células de Schwann, representando o principal suporte para a produção de energia nos axônios<sup>86</sup> (Figura 3.3).



**Figura 3.3 Esquema demonstrando o suporte metabólico oferecido pelas células gliais ao axônio.** O compartimento gliail, ou seja, células gliais armazenam glicogênio que pode ser mobilizado e metabolizado a lactato. O lactato gerado através do glicogênio ou diretamente da glicose será então encaminhado ao axônio, que o converterá novamente a piruvato, para a oxidação em sua mitocôndria e subsequente produção de energia. (Adaptado de Angus et al (2012).<sup>86</sup>

Com isso, o glicogênio armazenado nas células de Schwann pode ser mobilizado e convertido a piruvato. O piruvato gerado a partir do glicogênio ou diretamente da glicólise é então reduzido a lactato. Através de transportadores de monocarboxilatos (MCTs), o lactato é então transportado para o compartimento axonal, onde será reconvertido a piruvato e posteriormente oxidado nas mitocôndrias dos axônios.

## **JUSTIFICATIVA**

#### 4. Justificativa

Como já mencionado anteriormente, a hanseníase está relacionada à degradação axonal, fibrose e desmielinização nos nervos periféricos. Os mecanismos envolvidos na histopatologia da doença são diversos, e ainda não estão bem elucidados. Estudos do nosso grupo demonstraram diversas modulações do metabolismo energético de células de Schwann durante a infecção pelo *M. leprae*, como o aumento da captação de glicose, diminuição da capacidade oxidativa mitocondrial e o aumento da expressão da enzima G6PD em células infectadas e em fragmentos de lesão dérmica. No presente estudo, propomos identificar a importância da via das pentoses para o *M. leprae* e o possível impacto da fermentação de células de Schwann em neurônios. Observamos o aumento da capacidade fermentativa das células, com paradoxal redução na liberação de lactato, fato este que pode levar à privação energética e subsequente morte axonal *in vivo*, representando um novo mecanismo em potencial causador de dano neural na hanseníase

## **OBJETIVOS**

## 5. Objetivo Geral

Analisar o metabolismo fermentativo das células de Schwann da linhagem ST8814 durante a infecção pelo bacilo *M.leprae*

### 5.1 Objetivos específicos

- Avaliar a liberação de lactato em células de Schwann infectadas *in vitro* pelo *M. leprae*
- Analisar a expressão de genes associados ao metabolismo de glicose em células de Schwann;
- Analisar o impacto da modulação energética desencadeada pela infecção do *M. leprae* na célula de Schwann nos neurônios periféricos
- Analisar o fluxo de Carbono13 através de ferramenta metabolômica utilizando marcação isotópica de glicose-C<sup>13</sup> em células de Schwann infectadas *in vitro* pelo *M. leprae*, identificando as alterações do fluxo metabólico da célula infectada, assim como as fontes de carbono intracelular utilizadas pelo *M. Leprae*;
- Reversão da modulação do metabolismo glicídico induzido pela infecção através do uso de inibidores da via das pentoses ou da síntese de glutathione em células infectadas;



## **MATERIAIS E MÉTODOS**

## **6. Materiais e métodos**

### **6.1. Linhagem de células de Schwann**

As células de Schwann da linhagem ST8814 utilizadas no projeto foram isoladas a partir de células malignas de um paciente com neurofibromatose. O início da cultura foi feito a partir do descongelamento em banho-maria à 37°C, em seguida o conteúdo descongelado foi adicionado gota a gota em um volume de 10 mL de meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino. Foram então centrifugadas por 10 minutos a 300 xg a 4°C e o pellet gerado ressuspense em meio de cultura RPMI suplementado novamente com soro fetal bovino. Após a centrifugação, as células foram mantidas em garrafas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Quando se obteve a confluência, foram passadas para outras garrafas, adicionando-se uma solução salina contendo 0,125 % de tripsina por cerca de 1 minuto e meio na estufa a 37°C. O bloqueio da ação da tripsina foi através da utilização de um volume igual de soro fetal bovino. Em seguida, foram centrifugadas, após esta etapa, as células foram adicionadas em meio cultura ou soro fetal bovino e então contadas em câmara de Neubauer para posterior adição das células em placas ou garrafas de cultura, de acordo com a sua aplicação.

### **6.2 Obtenção dos explantes, dissociação e manutenção de cultura de células primárias**

Os Gânglios da raiz dorsal foram extraídos de camundongos balb/c neonatos e colocados em meio L-15. Após a retirada de todos os gânglios, o conteúdo celular foi centrifugado durante 5 minutos a 300xg, sob temperatura ambiente. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se 2 mL tripsina 0,125% ao pellet para a dissociação, deixando cerca de 30 minutos da estufa a 37°C. A neutralização da ação da tripsina foi feita através da adição 2mL de meio DMEM/F12 com soro fetal bovino. As células ressuspensas foram centrifugadas 600 xg a e contadas em câmara de Neubauer para o plaqueamento em placas de 24 poços com lamínula, previamente tratadas com 10µm de pol- D-lisina e 10µm de laminina. Durante a manutenção da cultura, foi adicionado 100nM do fator de crescimento neuronal (NGF) para o crescimento dos neuritos.

### **6.3 Obtenção do *Mycobacterium leprae***

Para os estudos com o *M. leprae* vivo, utilizou-se a cepa Thai-53, obtida através do modelo de infecção do coxim plantar de camundongos atímicos nude (nu/nu), cedidos pela Dra. Patrícia Sammarco Rosa do Instituto Lauro de Souza Lima, São Paulo. A inoculação do *M.leprae* foi feita no coxim plantar dos camundongos, com duração de cerca de seis meses de infecção.

Após este período os camundongos foram sacrificados e as patas contendo o bacilo foram encaminhadas para o laboratório de microbiologia celular do Instituto Oswaldo Cruz, onde o patógeno foi purificado, quantificado, e a sua viabilidade foi verificada através do kit *live-dead*. Nos experimentos, foi utilizado *M. leprae* com viabilidade acima de 80%. Bacilos mortos foram obtidos através de irradiação gama. Para os experimentos, foram utilizadas duas MOI diferentes, na proporção de 5:1 e 10:1.

#### **6.4 Análise da liberação de ácido láctico nos sobrenadantes durante a infecção**

Para a quantificação de lactato foram analisados os sobrenadantes de células controles e infectadas, com a adição de 1µM de 6-aminonicotinamida (ANAM), inibidor da via das pentoses. Estas células foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino sem a presença de vermelho de fenol para evitar a sua interferência na absorção de luz a 340 nm. O lactato foi quantificado através do kit lactato liquiform (Bioclin). Os sobrenadantes das culturas foram colocados de acordo com cada condição em uma placa de 96 poços, onde foi adicionado a solução de trabalho estabelecida pelo kit. Na presença de lactato, a enzima lactato oxidase promove a formação de piruvato e peróxido de hidrogênio. Em seguida, ocorre uma reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e TOOS, uma reação catalisada pela peroxidase, produzindo uma quinoneína que tem máximo de absorbância em 340 nm.

#### **6.5 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio usando DHE**

As células de Schwann em cultura foram mantidas sob as condições acima mencionadas, na ausência e na presença de diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio, 6-ANAM, DHE e *Mycobacterium leprae*. Após 24 horas de plaqueamento, as células foram expostas a 6-ANAM a uma concentração de 5 µM. Após 48 horas, as células foram infectadas pelo *M. leprae* ou exposta ao bacilo irradiado com a MOI de 50: 1 (50 bactérias para cada célula). Duas horas antes da marcação com DHE, através da exposição realizada com o traçador durante 30 min a 37°C, adicionou-se o peróxido de hidrogênio como controle positivo a uma concentração de 10 µM. Para quantificação da intensidade do sinal do DHE, as culturas foram tratadas com tripsina (1% de tripsina e neutralizou-se com PBS + soro). Em seguida, as amostras foram lidas no citômetro de fluxo marca BD FACS Aria IIu da plataforma de rede tecnológica da Fiocruz. As suspensões de células foram filtradas através de redes de 40µm

antes de serem adquirida no citômetro. Cerca de 5.000 eventos por condição foram adquiridos e a detecção de DHE foi analisada no canal de EP-A, após a exclusão de eventos identificados como grumos e/ou células mortas.

## **6.6 Análise da expressão gênica de proteínas-chave no metabolismo fermentativo e viabilidade do *Mycobacterium leprae***

As amostras das culturas infectadas ou não pelo *M. leprae*, com a adição de 1µM 6ANAM e 400µM de BSO, inibidores da via das pentoses e da glutatona, foram lisadas com trizol, homogeneizadas e então foi continuado o tratamento para separação e extração dos ácidos nucleicos. O RNA total obtido foi submetido a sua transcrição a cDNA para posterior análise da expressão gênica por PCR em Tempo Real utilizando-se o sistema SYBR Green (Applied Biosystems), seguindo as instruções do fabricante. Para cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse. As reações foram incubadas no sistema de PCR em tempo real StepOne Plus® (Applied Biosystems). A viabilidade do *M. leprae* foi feita através da detecção de seus níveis de RNAr 16s, conforme descrito por Martinez et. al. (2009) e a detecção dos genes do MCT1, MCT2, MCT4 a partir de primers específicos.

## **6.7 Imunocitoquímica de neurônios primários**

Foi adicionado sobrenadante oriundo de células de Schwann da linhagem St8814 na cultura de neurônios, na proporção de 1:2, ou seja, metade do meio RPMI condicionado por células de Schwann e a outra metade contendo meio DMEM/F12. Após 24h de cultura, os neurônios foram lavados com PBS, em seguida foram fixados com PFA a 4%, lavados com solução PBS e então foi acrescentado o anticorpo primário marcador de neurofilamento NF200 diluído 1:1000 em solução de bloqueio. A solução de bloqueio consiste em BCA, NGS e PBS. Após 30 minutos de incubação, a solução contendo o anticorpo primário foi retirada, as células lavadas em PBS, seguido de incubação com o anticorpo secundário Alexa488 diluído 1:500, durante 30 minutos. Por último as células foram marcadas com DAPI durante 1 minuto e montadas em lâminas. As imagens dos neurônios foram quantificadas através do programa ImageJ.

## 6.8 Análise dos destinos do carbono nas células de Schwann infectadas

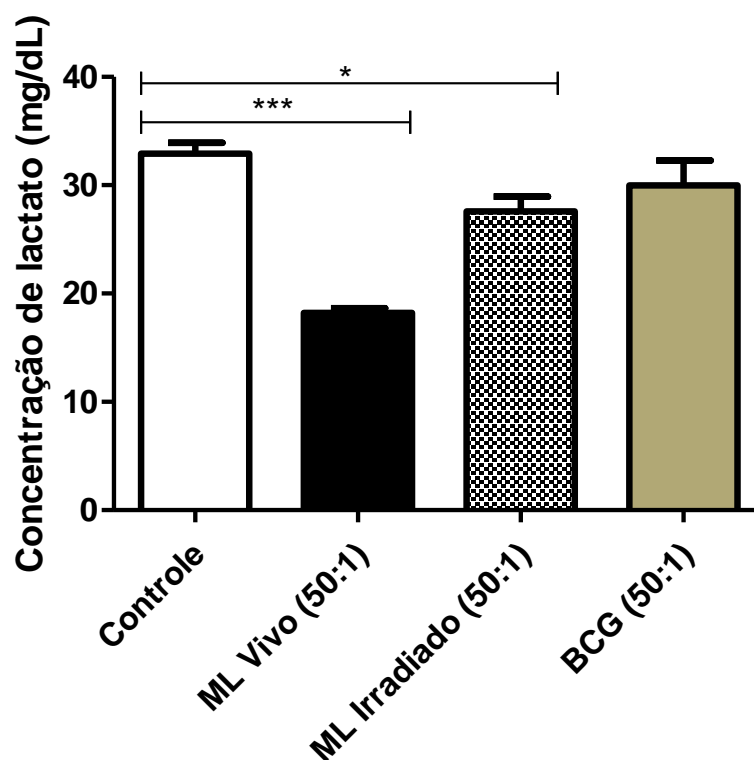
Para estabelecer a rota metabólica central da célula de Schwann infectada, utilizamos a glicose marcada com o isótopo estável  $C^{13}$  na posição 6, adicionada ao meio de cultura sem glicose para que as trocas de carbono entre o bacilo e a célula hospedeira sejam observadas. Foram mantidas duas culturas de células de Schwann, uma com as células mantidas durante três passagens com meio com adição de glicose marcada e outro adicionando-se glicose marcada após 48h de infecção. Após 5 dias de infecção as garrafas foram lavadas com PBS gelado e adicionadas de 3 mL de triton X-100 0,1% para a lise das células. Todo o conteúdo foi então centrifugado a 11.000 xg por 5 minutos a 4 °C para a separação dos sobrenadantes do *Mycobacterium leprae* dos componentes celulares. O sobrenadante (celular) e pellet (*M. leprae*) resultante desta centrifugação foram separados e foi adicionado HCL em ambos para a hidrólise em atmosfera de nitrogênio. Em seguida, o material resultante foi suspenso em água e secado no speedvac. As amostras foram então enviadas para o laboratório do Dr. Johnjoe MacFadden, na Universidade de Surrey, em Guilford, onde foram lidas por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, conforme descrito por Beste et al (2013).

## **RESULTADOS**

## 7. Resultados

### 7.1 Modulação do metabolismo fermentativo em células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*

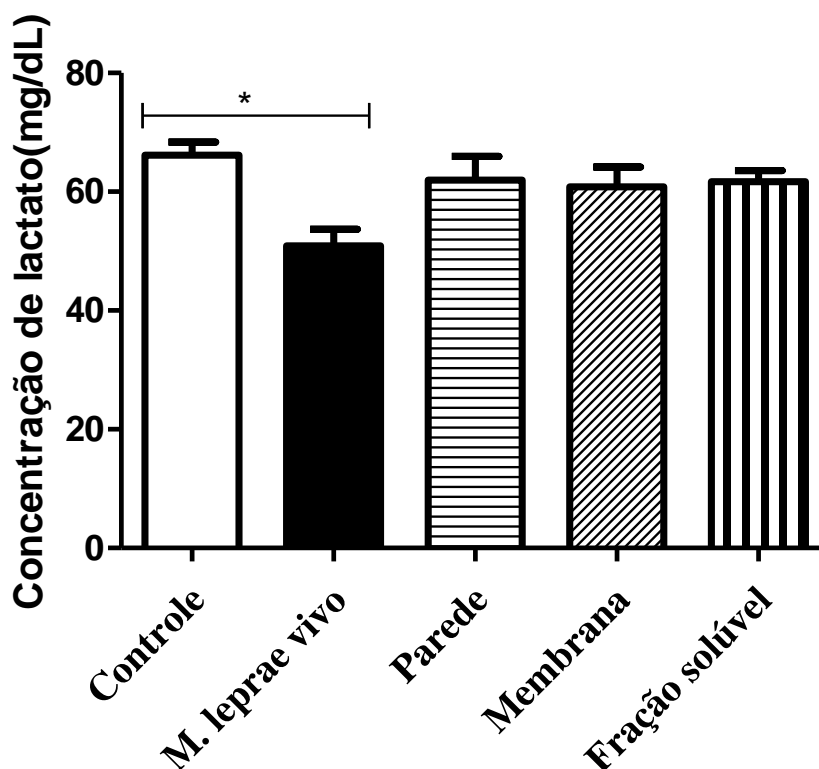
Tendo em mente a importância da célula de Schwann para o metabolismo axonal e partindo destes achados relacionando o aumento da captação de glicose e a baixa atividade mitocondrial com a infecção, buscou-se analisar as bases moleculares desta modulação no metabolismo fermentativo durante a infecção.



**Figura 7.1** Análise da concentração de lactato no sobrenadante de células de Schwann. O lactato nos sobrenadantes de células de Schwann da linhagem ST8814 foram quantificados após 48 horas de infecção com o *M. leprae*, exposição ao *M. leprae* irradiado e o *M. bovis* (BCG). Resultado obtido através de 3 experimentos independentes. Significância estatística calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*\*\*) $p < 0,001$  e \*) $p < 0,05$ .

Conforme mostrado na figura 7.1, células infectadas com *M. leprae* vivo exportam menos lactato para o meio. Para entendermos se esse mecanismo relacionado à diminuição na exportação do lactato é específica à infecção pelo *M. leprae*, foi utilizada outra microbactéria, o *Micobacterium bovis* (BCG), não patogênico, que não foi capaz de alterar a liberação de lactato pela célula hospedeira. Além disso, *M. leprae* inativado por radiação também não mostrou o mesmo efeito observado na célula infectada. Corroborando com o dado anterior, na figura 7.2 vimos que o mesmo efeito não é observado com as diferentes frações do *M.*

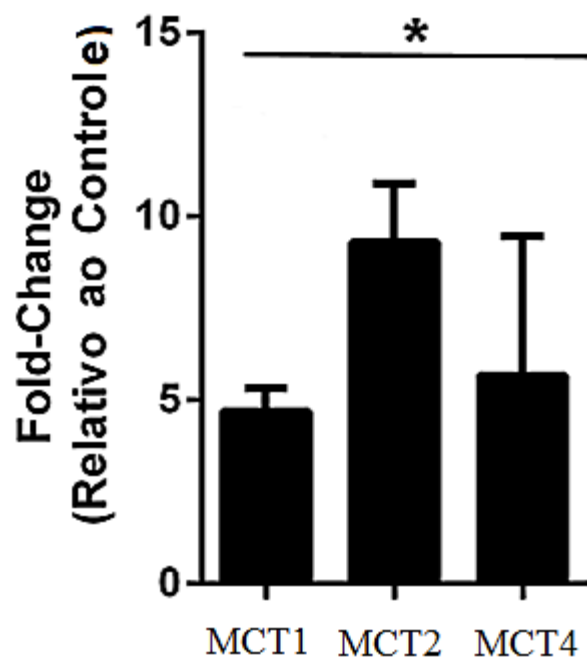
*leprae*, indicando que esse efeito é dependente de metabólitos do bacilo e não de seus antígenos.



**7.2 Análise da concentração de lactato no sobrenadante em células de Schwann expostas a frações do *M. leprae*.** A concentração de lactato foi aferida após 48h de infecção com o *M. leprae* vivo ou suas frações (parede, membrana e fração solúvel). A significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*  $p < 0.05$ ). Resultado obtido através de 3 experimentos independentes.

Como já mencionado anteriormente, os transportadores de monocarboxilatos (MCT) são proteínas de membrana responsáveis pelo transporte de lactato entre células de Schwann e axônios. Observamos na Figura 7.3 que células infectadas superexpressam os transportadores de monocarboxilatos descritos no sistema nervoso periférico. O presente dado demonstra que a redução na liberação de lactato no sobrenadante das células infectadas não está relacionada à redução de sua exportação para o meio, uma vez que todos os transportadores encontram-se superexpressos.

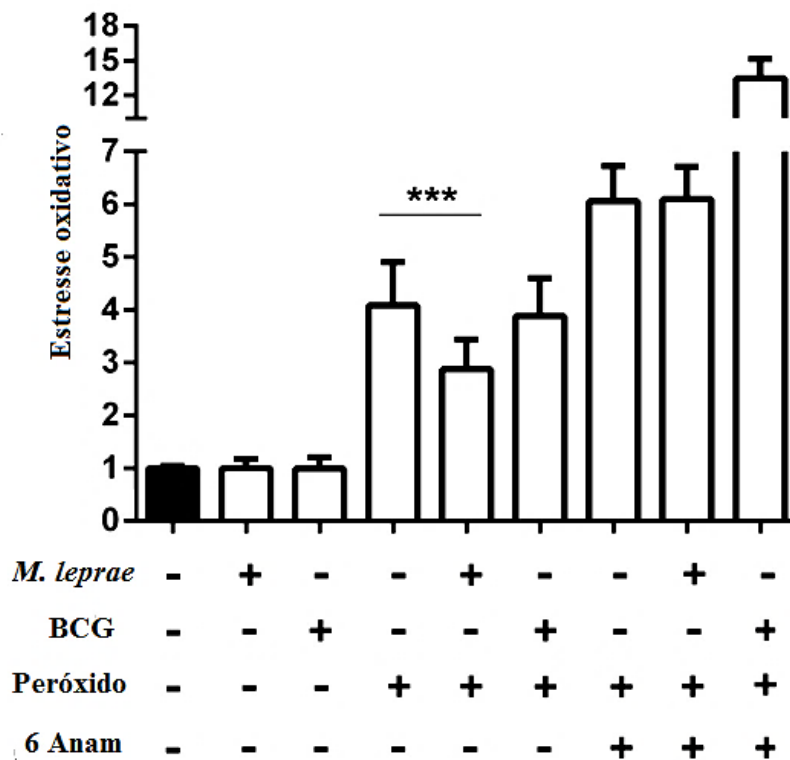




**Figura 7.3** Expressão relativa dos transportadores de monocarboxilatos MCT1, MCT2 e MCT4 em células de Schwann infectadas. A expressão dos transportadores foi aferida através de PCR em tempo real. Resultado obtido através 3 experimentos independentes. A análise estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*  $p < 0.01$ ).

## 7.2 Análise da produção de espécies reativas de oxigênio em células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*

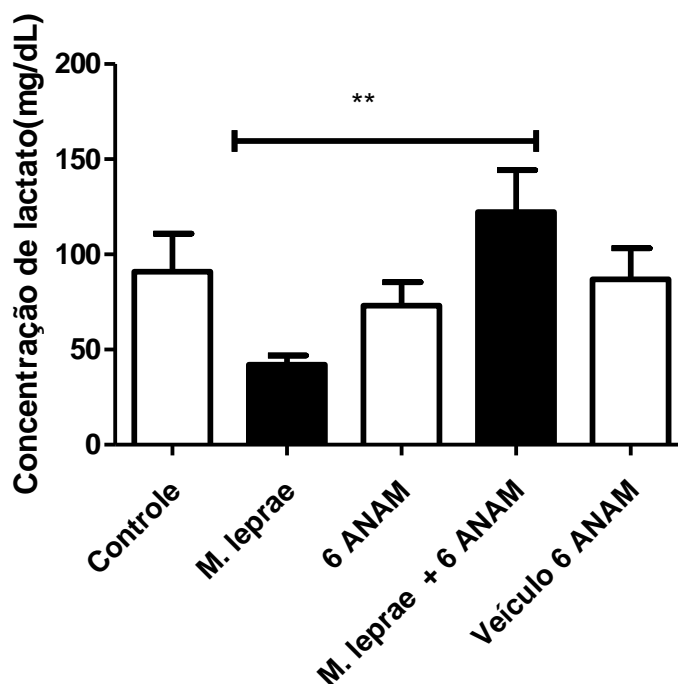
Devido ao aumento na expressão da G6PD relatado por nosso grupo de pesquisa, buscou-se avaliar o impacto desta modulação positiva sobre as defesas antioxidantes da célula infectada.



**7.4. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio durante a infecção e diferentes estímulos.** O estresse oxidativo foi medido pelo sinal de fluorescência do dihidroetideo (DHE) determinada por citometria de fluxo, após 48 horas de infecção. Células de Schwann foram estimuladas com peróxido de hidrogênio 2 horas da marcação com o DHE. Resultado obtido através de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi calculada por ANOVA seguida por Bonferroni (\*\*\*) $p < 0,0001$ ).

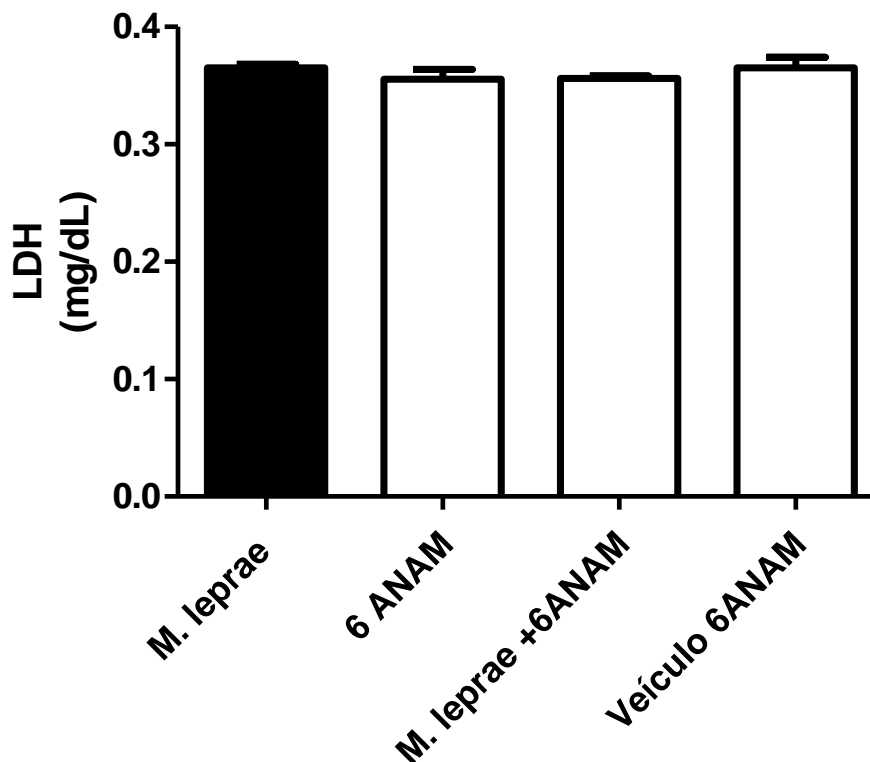
Células expostas ao estresse oxidativo apresentam danos aos lipídeos, proteínas e ao DNA, bem como o esgotamento dos níveis de ATP, gerando falha no funcionamento celular, podendo ocasionar em morte celular por necrose. Conforme mostrado na figura 7.4, a infecção pelo *Mycobacterium leprae* não é capaz de induzir o estresse oxidativo em células de Schwann, pelo contrário, o perfil gerado é protetor à célula hospedeira. Além disso, mesmo após a adição de peróxido de hidrogênio as células infectadas formaram menos espécies reativas de oxigênio, conforme vista pela menor marcação com DHE. Ao contrário do perfil observado com *M. leprae*, a incubação com *M. bovis* (BCG) gerou níveis maiores de estresse oxidativo. Com a utilização do 6-ANAM, inibidor específico da glicose 6-fosfato desidrogenase, primeira enzima da via das pentoses fosfato, esse efeito protetor foi abolido, demonstrando a importância da G6PD neste perfil protetor.

### 7.3. Análise da concentração de lactato após a inibição da via das pentoses fosfato



**Figura 7.5 Análise da concentração de lactato no sobrenadante de células de Schwann infectadas tratadas com 6ANAM.** Os sobrenadantes foram quantificados a partir do kit lactato liquiform, após 5 dias de infecção com *M. leprae*, com adição de 6Anam, inibidor da via das pentoses e o DMSO (veículo do 6-ANAM). Resultado obtido através de 3 experimentos independentes. A significância estatística foi calculada pelo teste ANOVA, seguida por teste de Friedman ( $p^{**}0,0082$ ).

Na tentativa de restaurar a liberação de lactato por células infectadas, células de Schwann infectadas foram tratadas com  $1\mu\text{M}$  de 6-ANAM e o lactato dessas culturas foi quantificado. Através da utilização deste inibidor, podemos observar a reversão da liberação de lactato em células infectadas (Figura 7.5). Por se tratar de uma via crucial para a sobrevivência da célula de Schwann, determinamos a viabilidade das células utilizadas no supracitado experimento através da dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH) nos mesmos sobrenadantes, de modo a assegurar que o efeito observado não está relacionado à morte e subsequente lise celular. A LDH por sua vez é uma enzima citosólica, de modo que observá-la no meio significa que as células tiveram a sua membrana plasmática rompida. Não houve diferença entre as diferentes condições na concentração de LDH no meio (Figura 7.6).

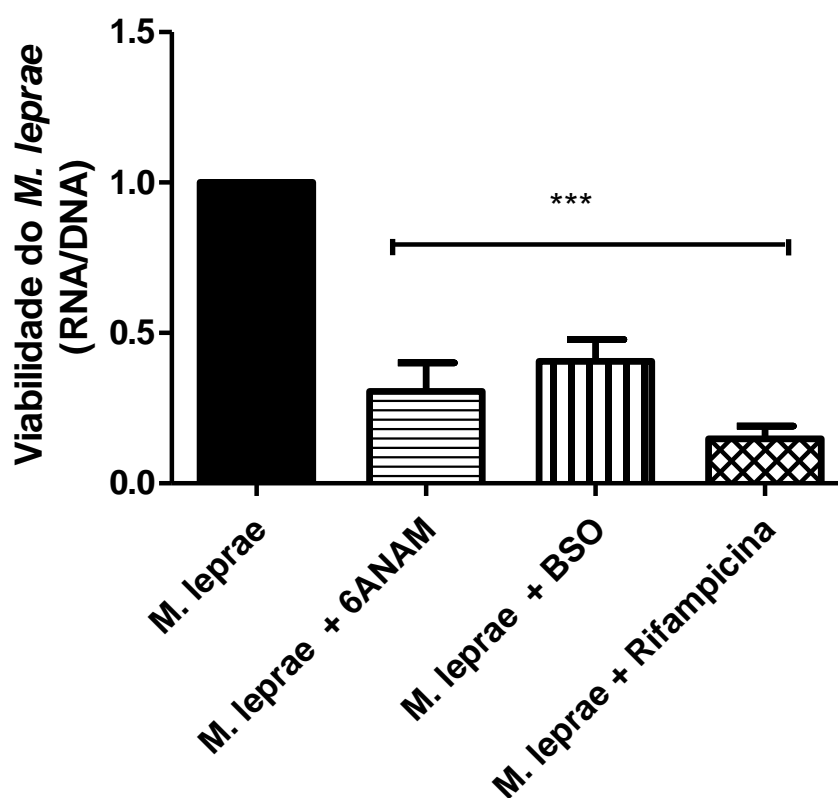


**Figura 7.6 Viabilidade celular através quantificação da enzima LDH no sobrenadante de células de Schwann da linhagem ST8814.** Células de Schwann foram infectadas com *M. leprae* (MOI 50:1), tratadas com 6ANAM ou seu veículo DMSO. A quantificação da enzima lactato desidrogenase foi feito através do Kit LDH liquiform. Este resultado representa a análise de 3 experimentos independentes.

Com isso, é possível observar que a concentração utilizada do 6-ANAM não causou a morte de células, somente do *M. leprae*.

#### **7.4 Viabilidade de *Mycobacterium leprae* com o uso do 6ANAM, inibidor da via das pentoses fosfato**

Determinamos a viabilidade do *M. leprae* após inibição da via das pentoses e glutathiona. Além disso, também foi utilizado a rifampicina, antibiótico amplamente utilizado no tratamento da Hanseníase. Através desse dado conseguimos inferir que a recuperação nos níveis de liberação de lactato nas células de Schwann provavelmente se deve à inativação do bacilo. A Figura 7.7 mostra a diminuição da sua viabilidade quando as células são tratadas com 6-ANAM e o inibidor da síntese de glutathiona butionina sulfoximina (BSO). Esse dado sugere a importância da via das pentoses para o metabolismo do bacilo, abrindo novas abordagens para o controle da doença através de estratégias voltadas à interferência de vias do próprio hospedeiro.

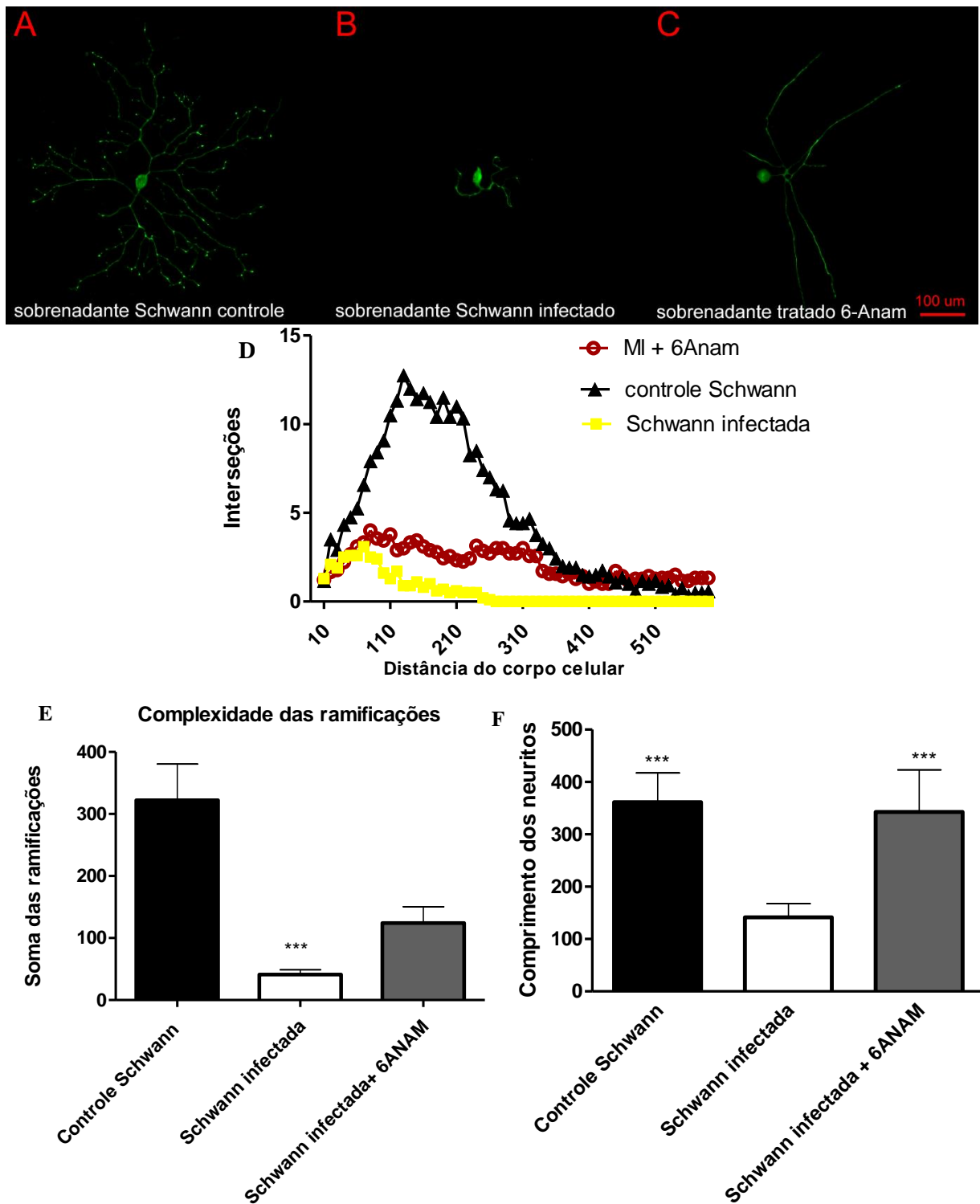


**Figura 7.7 Viabilidade intracelular do *M. leprae* após tratamento com o inibidores da via das pentoses (6anam) e glutatona(BSO).** Após 5 dias de infecção a viabilidade do bacilo foi aferida através da relação RNA/DNA por PCR em Tempo-Real. A utilização do 6ANAM e BSO em células infectadas diminui a viabilidade do bacilo, aproximando-se da morte observada com a utilização da rifampicina. Resultado representativo de 3 experimentos independentes. Análise estatística foi feita a partir de ANOVA seguida de Bonferroni (\*\*\*) $P < 0.05$ ).

O 6-ANAM mostrou-se promissor na reversão da liberação de lactato das células de Schwann infectadas, assim, sendo uma droga em potencial para o estudo do possível papel da redução nos níveis de lactato como base molecular da neuropatia hansênica.

### 7.5 Adição de sobrenadantes de células de Schwann infectadas em neurônios

Gânglios da raiz dorsal foram extraídos de camundongos neonatos e então dissociados para a obtenção de neurônios primários. A cultura destes neurônios foi mantida durante 24h, contendo cada condição metade do meio DMEN/F12 e a outra metade com o meio condicionado do experimento anterior. Como já era esperado, a infecção por *M. leprae* causa liberação de fatores, por parte das células de Schwann, que causam danos à formação de neuritos e expansão neuronal.



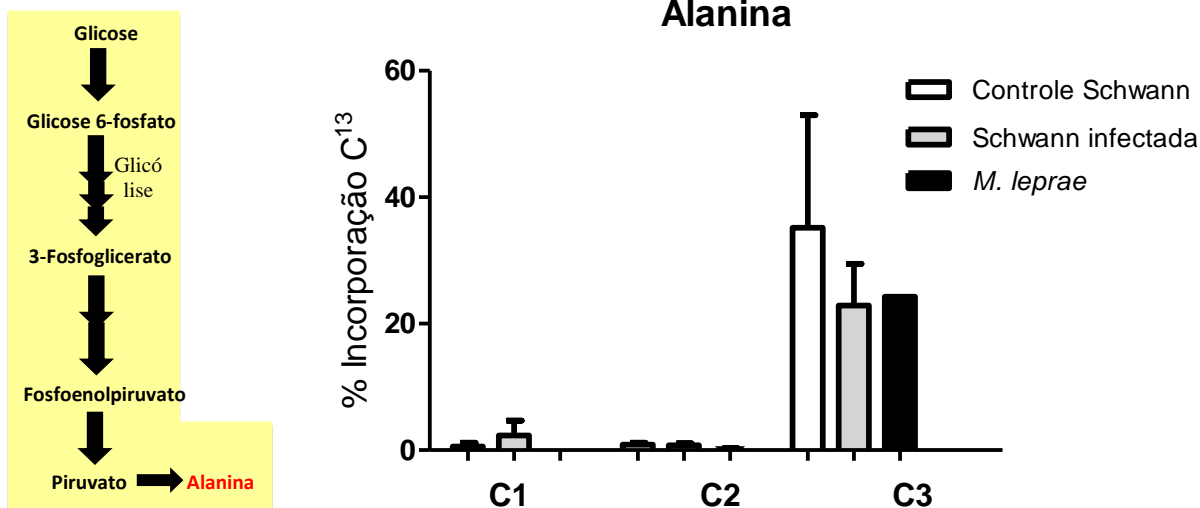
**Figura 7.8** Análises de neurônios primários após a adição de sobrenadantes de células de Schwann. Os neurofilamentos foram marcados com o anticorpo NF200 (Alexa Fluor 488). A, B e C representam os neurônios tratados com sobrenadantes de Schwann controle, infectada e infectada tratada com 6ANAM, respectivamente. D, E e F são as quantificações a partir das imagens. Onde, D representa o número de interseções, E a complexidade das ramificações e F comprimento máximo dos neuritos. Os gráficos são resultados 3 experimentos independentes. Análises estatísticas foram feitas a partir do teste ANOVA, seguida de teste de Bartlett's. ( $p^{***} 0,0001$ ).

Na figura 7.8 foi observado o efeito da adição de sobrenadantes de culturas de células da linhagem ST8814 (células de Schwann controles, infectadas pelo *Mycobacterium leprae* ou, ainda, células de Schwann infectadas tratadas com o 6ANAM) em neurônios periféricos. Este meio condicionado foi adicionado na hora do plaqueamento, bem como em todas as condições foi acrescentado o fator de crescimento neuronal (NGF). A utilização do 6-ANAM não impediu a diminuição da ramificação, porém reverteu o estímulo supressor da extensão axonal. Demonstrando a partir dos fenótipos neuronais acima mostrados, podemos sugerir que esta via representa uma rota importante para o bacilo e que sua inibição pode apresentar efeitos terapêuticos na Hanseníase.

## **7.6 Análise do fluxo de carbono de células infectadas e do *M. leprae***

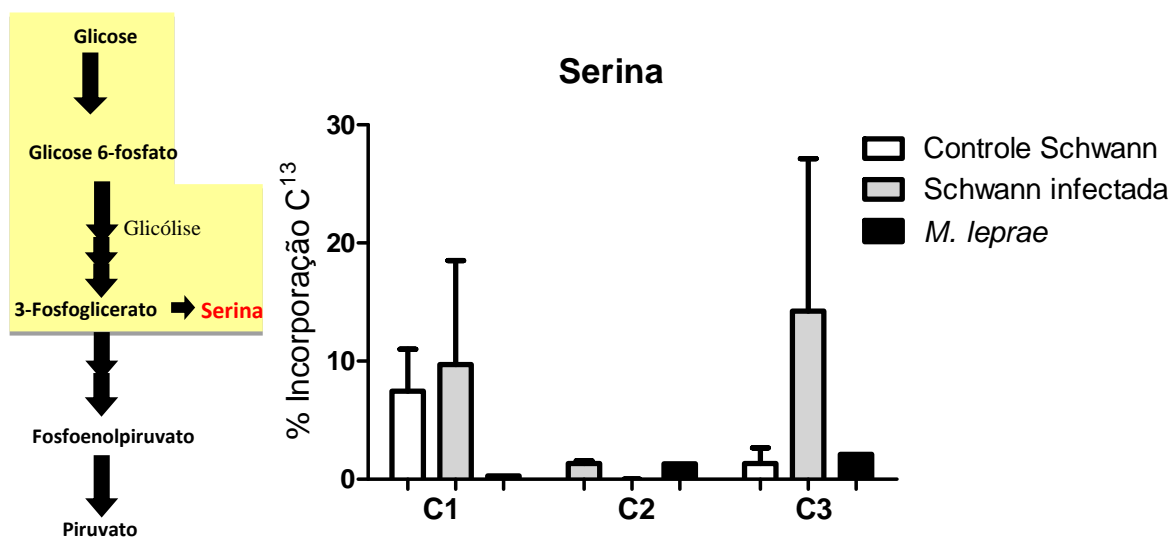
No intuito de observar possíveis modulações do metabolismo central da célula de Schwann durante a infecção pelo *M. leprae*, demos um pulso de 1g de glicose-<sup>13</sup>C6 por 500ml de meio RPMI em células infectadas e controles após 48h de infecção, momento em que a modulação responsável pelo decréscimo de lactato na célula infectada já se estabeleceu. O alvo de nossas análises foram os aminoácidos, identificando a abundância relativa de <sup>13</sup>C em cada um dos seus carbonos através de nano-HPLC acoplado a um espectrômetro de massas. Através das diferenças no destino do C6 da glicose entre células infectadas e controle, podemos inferir sobre a atividade de cada via, assim como a abundância de alguns metabólitos intermediários.

Para a identificação da marcação isotópica dos aminoácidos oriundos do *M. leprae*, realizamos um ensaio de marcação, e não mais de pulso, ficando a cultura de células infectadas em contato com a glicose-<sup>13</sup>C6 por 96h. Dados preliminares da análise do fluxo de carbono de células infectadas demonstraram que em aminoácidos sintetizados a partir do piruvato como a alanina tiveram menor incorporação do carbono 6 da glicose durante a infecção (figura 7.9).



**Figura 7.9** Análise da incorporação de  $^{13}\text{C}$  em alanina em células de Schwann e *M. leprae* expostos a D-glicose- $^{13}\text{C}6$ . Os números do eixo X informam a posição dos carbonos em relação ao grupamento amina. Podemos observar a abundância da marcação isotópica no carbono 3 da alanina, oriundo do carbono 3 do piruvato, que por sua vez é originário do carbono 6 da glicose. Gráficos representativos de um experimento realizado em duplicata (células controles e infectadas) e *M. leprae* apenas uma leitura.

A serina, por sua vez é formada a partir do 3-fosfoglicerato, molécula anterior à reação que leva a formação de piruvato. O carbono 1 e 3 da serina apresentaram marcação isotópica, no entanto apenas o carbono da posição 3 se mostrou diferentemente marcado, sendo mais abundante nas células infectadas e no *M. leprae* (Figura 7.10).



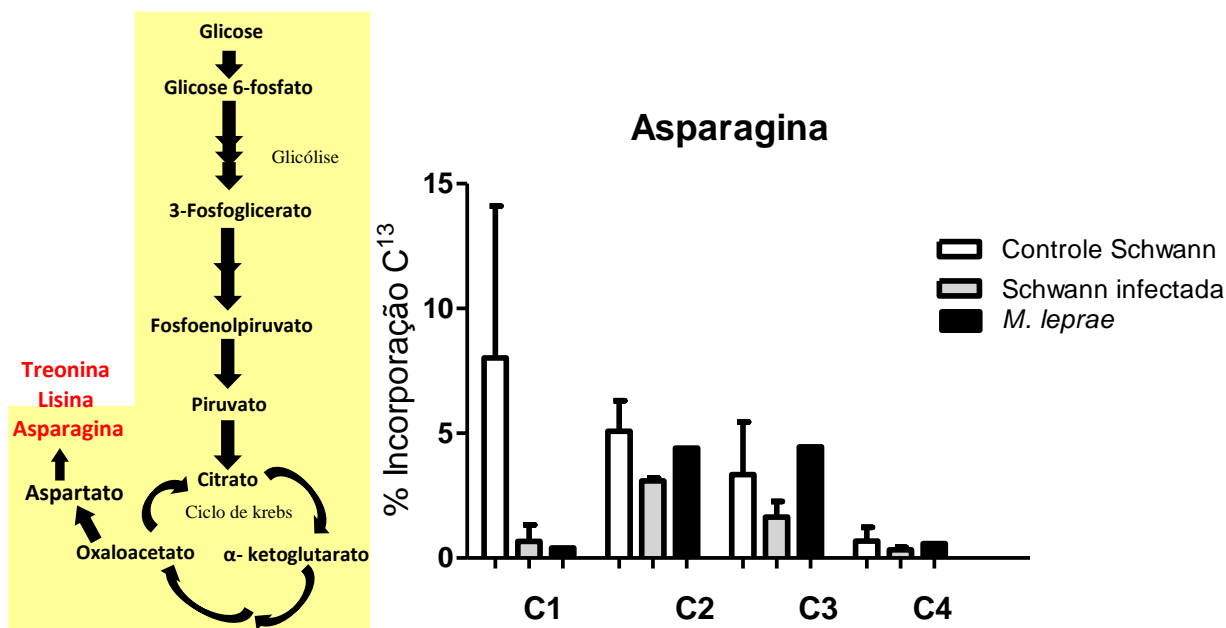
**Figura 7.10** Análise da incorporação de  $^{13}\text{C}$  em serina em células de Schwann e *M. leprae* expostos a D-glicose- $^{13}\text{C}6$ . Os números do eixo X informam a posição dos carbonos em relação ao grupamento amina. Podemos observar a abundância da marcação isotópica no carbono 3 da serina, oriundo do carbono 3 do 3-fosfoglicerato, que por sua vez é originário do carbono 6 da glicose. Gráficos representativos de um experimento realizado em duplicata (Células controles e infectadas) e *M. leprae* apenas uma leitura.



O carbono 3 da serina, presente apenas nas células infectadas, é oriundo do carbono 3 do 3P-glicerato, que por sua vez é originário do C6 da glicose, indicando que apenas as células infectadas acessam o 3P-glicerato diretamente da glicólise, estando esse intermediário gerado a partir dessa via mais disponível nestas células, seja por ser mais sintetizado, seja por ser menos utilizado na reação subsequente.

No entanto em ambas as condições também observamos marcação isotópica no carbono 1 da serina. A marcação no carbono 1 indica que uma parte deste aminoácido está sendo sintetizada a partir da gliconeogênese. Ao entrar no ciclo de Krebs, o carbono 3 do piruvato (portador da marcação isotópica) torna-se o carbono 2 do citrato. A cada volta do ciclo, gera-se um oxaloacetato contendo mais um carbono marcado, tendo em vista que os carbonos decarboxilados a  $\text{CO}_2$  ao longo do Ciclo de Krebs são sempre os mais distais da carbonila oriunda da condensação do oxaloacetato com o acetil-CoA (contendo o carbono 2 marcado do piruvato). Dessa forma, o oxaloacetato gerado após o ciclo de Krebs pode apresentar inicialmente os carbonos 2 ou 3 marcados, e posteriormente, após sucessivas adições de novos acetil-CoA, qualquer carbono marcado, gerando através da gliconeogênese fosfoenolpiruvato marcado em qualquer carbono. Dessa forma a marcação isotópica da serina no carbono 1 demonstra a incorporação do oxaloacetato à síntese da serina após várias passagens pelo ciclo de Krebs e posterior gliconeogênese em células infectadas ou não.

Já o desvio do oxaloacetato para a síntese da asparagina por exemplo (Figura 7.11), foi alterado pela infecção. Seus carbonos 1, 2, 3 e 4 são formados diretamente pelos carbonos 1, 2, 3, e 4 do oxaloacetato. Dessa forma podemos observar indistintamente em ambas as condições, infectado e controle, a marcação nos carbonos 2, oriundo direto da glicólise, e 3, gerado após 1 passagem pelo ciclo de Krebs. No entanto a marcação no carbono 1, gerada após sucessivas passagens pelo ciclo de Krebs, só pôde ser visualizada nas culturas controles, indicando que as células infectadas não possuem o ciclo de Krebs tão ativo. Este dado foi também observado na distribuição isotópica da asparagina acumulada pelo *M. leprae*.



**Figura 7.11** Análise da incorporação de <sup>13</sup>C em asparagina em células de Schwann e *M. leprae* expostos a D-glicose-<sup>13</sup>C6. Os números do eixo X informam a posição dos carbonos em relação ao grupamento amina. O carbono 2 é oriundo diretamente da glicólise, enquanto os carbonos 3 e 1 são gerados a partir de uma passagem pelo ciclo de Krebs e sucessivas passagens pelo ciclo, respectivamente. Gráficos representativos de um experimento realizado em duplicata (Células controles e infectadas) e *M. leprae* apenas uma leitura.

Outros aminoácidos como a lisina e a treonina também são sintetizados a partir do aspartato. A lisina apresentou marcação isotópica no carbono 1, indicando que o piruvato utilizado para sua síntese veio exclusivamente da ação da enzima málica, caso contrário a marcação seria encontrada no carbono 2 da lisina, o que ocorre de maneira residual, conforme mostrado na figura 7.12. Reforçando esse dado, mesmo a marcação da lisina oriunda do patógeno apresentou sua marcação no carbono 1.

A enzima málica, relatada ativa durante a infecção neste modelo, transpõe a marcação original do carbono 3 do piruvato para a posição 2, através da sua passagem pelo ciclo de Krebs, gerando oxaloacetato marcado na posição 2 e subsequentemente malato e piruvato marcados na posição 2, que após a perda de um carbono pela ação da diaminopimelato descarboxilase, se torna o carbono 1 do aminoácido em questão.<sup>64</sup>

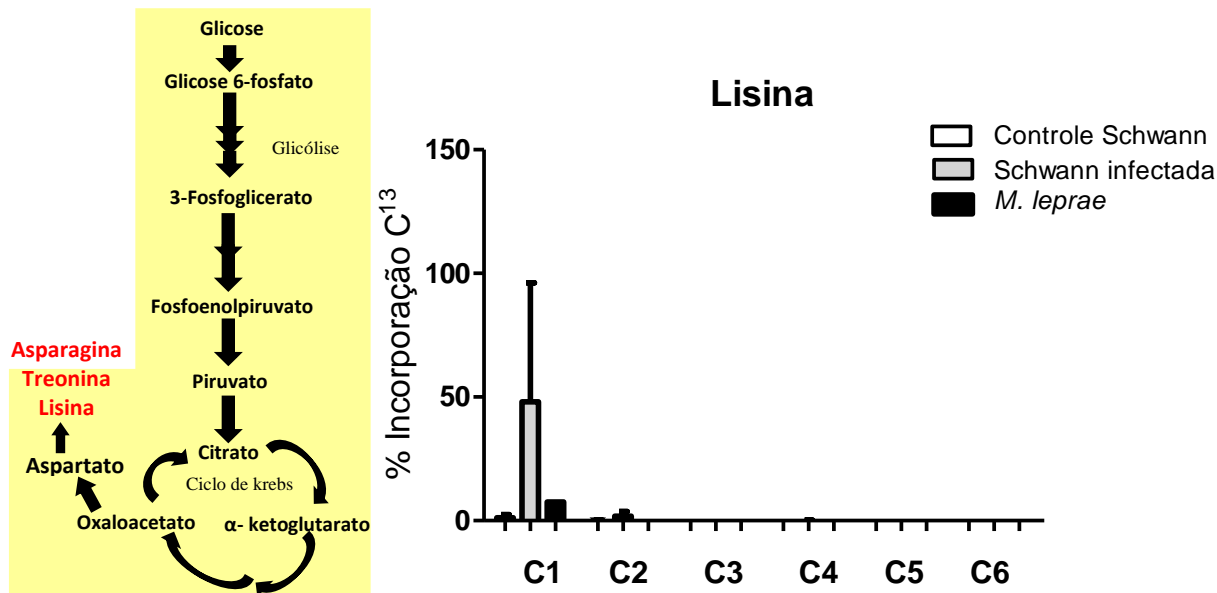


Figura 7.12 Análise da incorporação de  $^{13}\text{C}$  em lisina de células de Schwann e *M. leprae* expostos a D-glicose- $^{13}\text{C}6$ . Lisina e seu carbono 1 intensamente incorporado em células infectadas e também pelo *M. leprae*. oriundo da enzima málica. Gráficos representativos de um experimento realizado em duplicata (Schwann controle e infectada) e *M. leprae* apenas uma leitura.

Já a treonina por se tratar de aminoácido essencial, não é possível inferir através desse dado qualquer comparação entre a atividade da enzima málica na célula controle e infectada. No caso da treonina, a marcação distribuída através das posições 1, 2 e 4 indicam que a mesma não foi sintetizada diretamente do oxaloacetato, o que contribuiria para a marcação dos carbonos 2 e 3 (figura 7.13). Neste caso a treonina poderia ser sintetizada a partir de um oxaloacetato que ciclou várias vezes pelo ciclo de Krebs, tornando-se randomicamente marcado, ou através de alguma outra via desconhecida pertencente ao metabolismo do *M. leprae*.

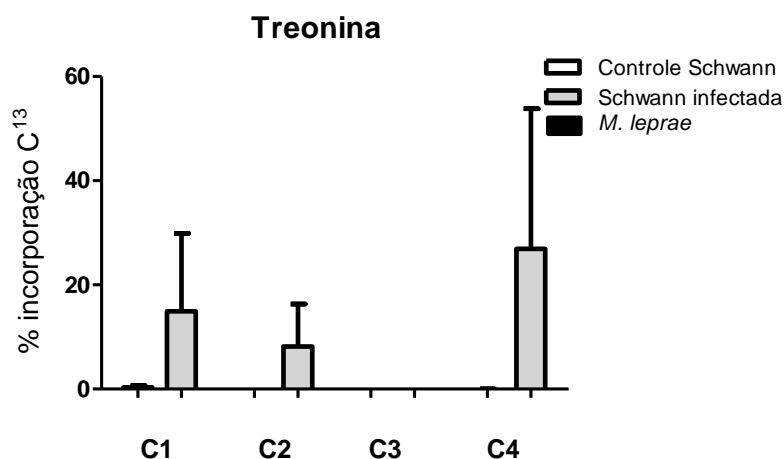
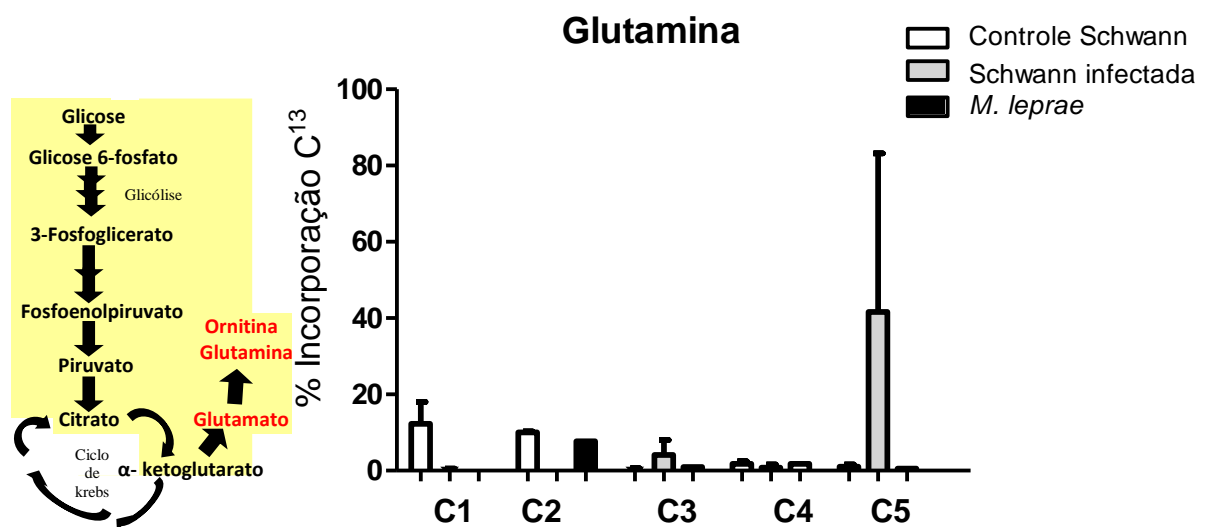


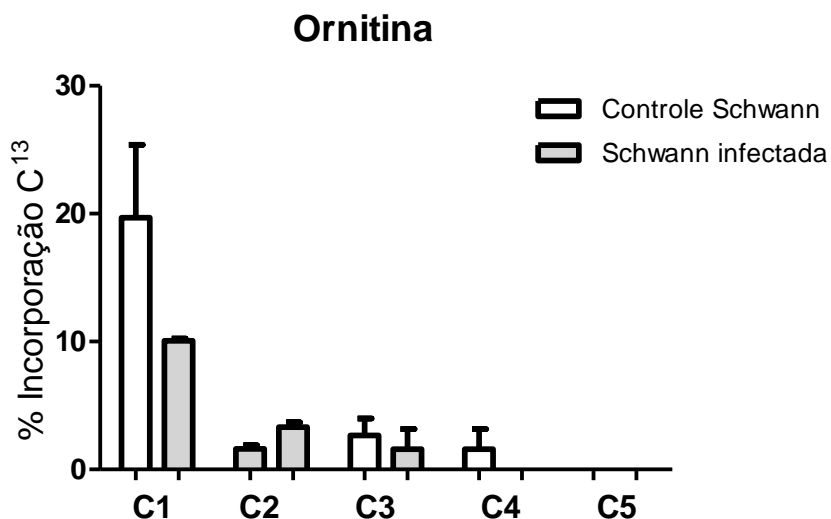
Figura 7.13 Análise da incorporação de  $^{13}\text{C}$  em Treonina de células de Schwann e *M. leprae* expostos a D-glicose- $^{13}\text{C}6$ . Em A treonina com incorporação do carbono marcado em seus carbonos 1, 2 e 3. Gráficos representativos de um experimento realizado em duplicata (Schwann controle e infectada) e *M. leprae* apenas uma leitura.

Outros aminoácidos oriundos do ciclo de Krebs também foram identificados (Figura 7.14;7.15). Os dados mais consistentes foram observados na distribuição isotópica dos aminoácidos glutamina e ornitina. Um dado curioso foi obtido a partir da distribuição da glutamina. Células infectadas apresentaram forte marcação no carbono 5 deste aminoácido. Normalmente seria esperado marcação na posição 4, em caso de síntese direta a partir de  $\alpha$ -cetoglutarato. No entanto observamos marcação distribuída entre os carbonos 1 e 2 nas células controle, indicativo de captação de um  $\alpha$ -cetoglutarato que circulou diversas vezes pelo ciclo de Krebs, tornando-se homoganeamente marcado, assim como a glutamina oriunda do *M. leprae*. Já nas células infectadas, apenas o carbono da posição 5 encontra-se marcado. Uma explicação plausível para esse fenômeno seria a retirada sucessiva dos carbonos 1 e 2 do citrato para a síntese de acetil-CoA para a síntese de lipídeos, através do ação da enzima citrato liase, demonstrada por nosso grupo ativa nesse modelo.



**Figura 7.14** Análise da incorporação de  $^{13}\text{C}$  em glutamina de células de Schwann controles e infectadas por *M. leprae* expostos a D-glicose- $^{13}\text{C}6$ . Os números do eixo X informam a posição dos carbonos em relação ao grupamento amina. Podemos observar a abundância da marcação isotópica no carbono 5 da glutamina, possivelmente oriundo do citrato. Gráficos representativos de um experimento realizado em duplicata (Schwann controle e infectada) e *M. leprae* apenas uma leitura.

Já o aminoácido não proteinogênico ornitina, naturalmente sintetizado a partir da glutamina, apresenta a mesma distribuição isotópica nas células controle, como esperado. No entanto, nas células infectadas, sua distribuição é totalmente distinta, demonstrando que a mesma não é oriunda da glutamina. Uma explicação razoável para tal fenômeno seria sua captação a partir do ciclo da uréia, onde sua distribuição seria semelhante à esperada, sem enriquecimento de marcação no carbono 5, e observada nas células controle, porém em menor abundância.



**Figura 7.15** Análise da incorporação de  $^{13}\text{C}$  em ornitina de células de Schwann controles e infectadas por *M. leprae* expostos a D-glicose- $^{13}\text{C}6$ . Os números do eixo X informam a posição dos carbonos em relação ao grupamento amina. Gráficos representativos de um experimento realizado em duplicata.

Os aminoácidos tirosina e fenilalanina possuem em sua origem biosintética a reação entre a eritrose-4-fosfato e o fosfoenolpiruvato, gerando marcação direta nos carbonos 7 e 6 da tirosina e fenilalanina, respectivamente. Células infectadas apresentaram elevada incorporação no carbono 6, indicando foi sintetizada através da incorporação direta da eritrose 4-fosfato formado na via das pentoses fosfato (figura 7.16).

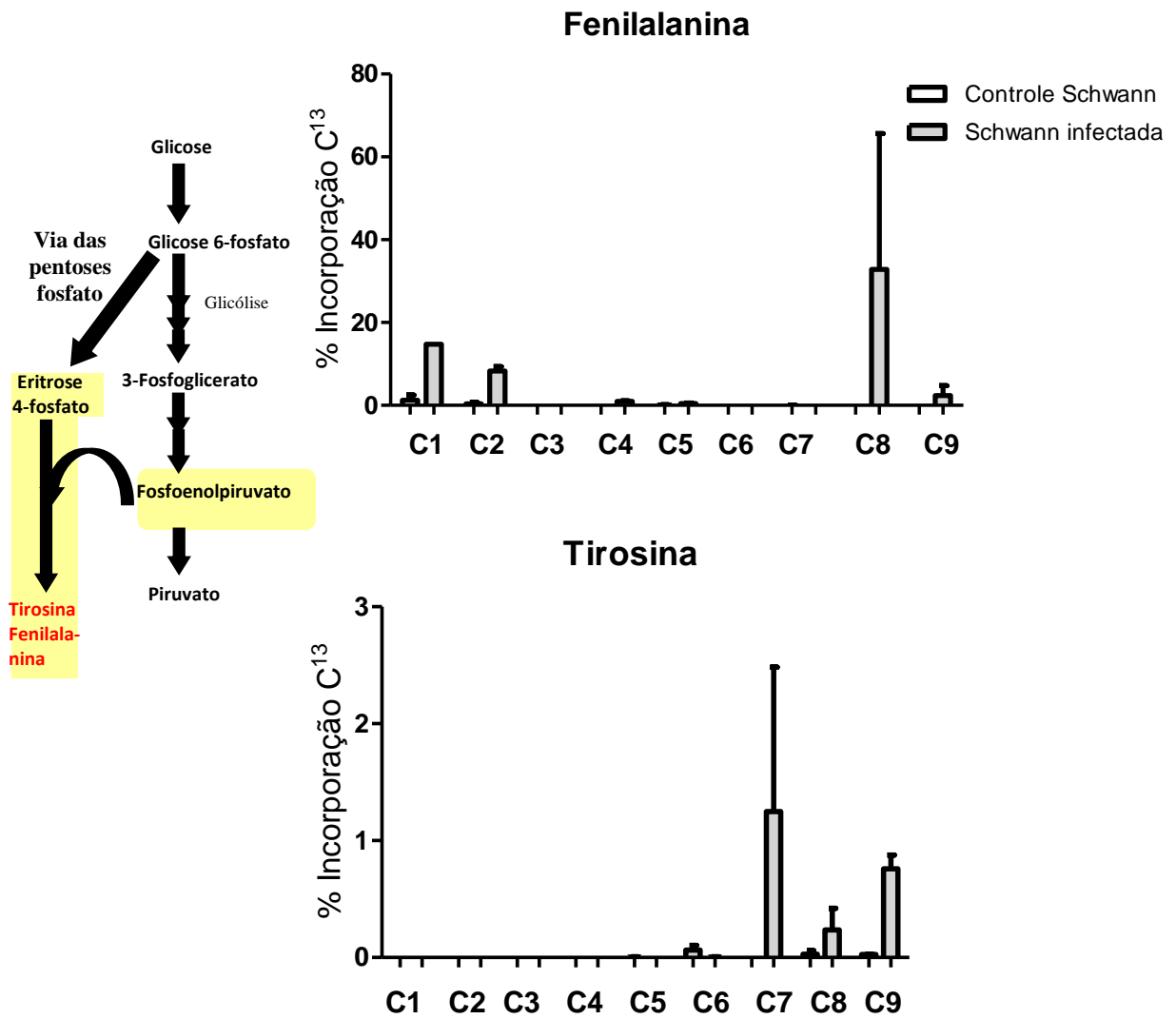


Figura 7.16 Análise da incorporação de  $^{13}\text{C}$  em fenilalanina e tirosina em células de Schwann controles e infectadas expostas a D-glicose- $^{13}\text{C6}$ . O carbono 6 e 7 dos dois aminoácidos é oriundo da eritrose 6-fosfato, metabólito formado na via das pentoses fosfato. Resultado gerado a partir de um ensaio experimental em duplicata.

## **DISCUSSÃO**

## 8. Discussão

A hanseníase acomete milhares de pessoas, sobretudo nos países em desenvolvimento. A taxa de prevalência da doença tem declinado nos últimos anos, no entanto a detecção de novos casos mantém-se estável de acordo com os últimos boletins emitidos pela Organização Mundial da Saúde. Esta patologia tem como grande característica o comprometimento do sistema nervoso periférico, através da infecção pelo *Mycobacterium leprae*. Os mecanismos que levam ao dano neural permanecem pouco claros, até o momento acredita-se que os nervos sejam lesados a partir da infecção do *M. leprae* no parênquima neural, gerando o recrutamento de macrófagos e subsequente inflamação local.<sup>1,63</sup> O bacilo é bem adaptado para infectar e permanecer silenciosamente em macrófagos e células de Schwann. Recentemente foi demonstrado por Ribeiro e colaboradores através de ensaios de infecção de macrófagos *in vitro* que o IGF-1 produzido por estas células inibe mecanismos antimicrobianos através do bloqueio da via de sinalização JAK/STAT1, promovendo a sobrevivência do patógeno nestas células.<sup>87</sup>

Resultados em paralelo com o presente estudo demonstraram alterações no metabolismo das células de Schwann e expressão de enzimas-chaves em nervos e lesões de pele de pacientes. Entre as alterações observadas estavam a maior captação de glicose pelas células infectadas e, além disso, estas mesmas células apresentaram expressão aumentada da enzima málica, citrato liase. A enzima lactato desidrogenase isoforma M, capaz de converter o piruvato em lactato teve sua expressão diminuída e a enzima glicólise-6-fosfato desidrogenase foi observada aumentada, ambas observadas através de PCR em tempo real de fragmentos de lesão de pele e nervos de pacientes multibacilares (LL).<sup>72</sup>

Inicialmente, os dados mostraram-se compatíveis com um fenótipo correlato ao efeito Warburg, observado em células cancerosas. Este efeito foi descrito em células cancerosas por Otto Warburg na primeira metade do século XX.<sup>88</sup> Apesar da maior eficiência do metabolismo respiratório mitocondrial em comparação à glicólise na produção de energia, as células tumorais obtêm energia preferencialmente através da via glicolítica anaeróbia.<sup>89</sup>

No entanto, apesar da célula infectada captar mais glicose<sup>72</sup>, nossos dados demonstraram que a formação da lactato, produto final da fermentação, encontra-se diminuída durante a infecção (figura 7.1), o que nos levou a criar a denominação warburg-like para o estado metabólico da célula infectada. O Lactato tem sido demonstrado desempenhando um papel chave no suporte metabólico dos neurónios / axónios no sistema nervoso central por astrócitos e oligodendrócitos através de transportadores de monocarboxilatos (MCTs).Atualmente,



diversos trabalhos destacaram o seu igual papel no sistema nervoso periférico. Domènech-Estévez e colaboradores demonstraram a presença de MCT1, MCT2, e MCT4 no sistema nervoso periférico de ratos e que o silenciamento de MCT1 em co-culturas de neurônios e células de Schwann diminuiu o processo de mielinização. Além de observar também que células de Schwann crescidas em meio rico em lactato exibiram um aumento no nível dos genes *Krox20/EGR2* e *P0*, ambos reguladores de mielina.<sup>90</sup> A célula de Schwann, geradora da bainha de mielina, sempre esteve associada à função de isolante relacionado a rápida transmissão dos potenciais de ação neuronais.

Entretanto, a literatura recente sugere que a célula de Schwann é muito mais versátil, fornecendo não só energia para os axônios na forma de lactato, como também transferindo para o mesmo complexos ribossomais e RNA.<sup>91,92</sup> Além disso, as células de Schwann podem promover a integridade axonal independente do grau de mielinização por mecanismos mal compreendidos. Os modelos atuais sugerem que o metabolismo das células de Schwann é crítico para esta função de apoio. O receptor de membrana *LKB-1 (Liver kinase B1)*, fosforila e ativa a proteína quinase adenosina- monofosfato (AMPK), esta enzima apresenta um papel regulador no metabolismo lipídico e da glicose em resposta a alterações nos níveis de energia e nutrientes celulares. A eliminação de *LKB-1* em células de Schwann levou a anormalidades na homeostasia energética nervosa, gerando o aumento da liberação de lactato de forma compensatória para apoio ao metabolismo energético dos axônios.<sup>93</sup>

Em nossas análises, apesar da diminuição de lactato observada (figura 7.1 e 7.2), todos os MCTs foram hiperexpressos (figura 7.3), indicando que a redução drástica de lactato no sobrenadante das culturas infectadas está de fato relacionado à redução na síntese e não em sua exportação.

A utilização do 6-ANAM, inibidor da via das pentoses fosfato restaurou os níveis de lactato secretados por células de Schwann infectadas (figura 7.5). Esta via parece ser uma rota muito importante para o bacilo, pois observamos uma grande redução na viabilidade do *M. leprae* com a adição deste inibidor. Um impacto semelhante ao observado pela adição de BSO, inibidor da síntese de glutatona, e rifampicina, o fármaco utilizado no tratamento de pacientes com Hanseníase (figura 7.7).

O sistema glutatona é regenerado a partir do NADPH gerado na via das pentoses. Este sistema por sua vez age no combate de espécies reativas de oxigênio. Curiosamente, a infecção por *M. leprae* confere um perfil protetor, favorecendo o controle do estresse oxidativo na célula hospedeira, permitindo a manutenção da viabilidade do bacilo e assim a

sua proliferação, distante de mecanismos que poderiam gerar estresse oxidativo e assim, sua morte. (figura 7.4).

Em nossos resultados com cultura de neurônios primários (Figura 7.8) foram observados que o fenótipo de atrofia neuronal gerado a partir da adição de sobrenadante de células de Schwann infectadas é parcialmente restaurado com a adição de sobrenadante infectado tratado com 6-ANAM. Apesar da melhora no fenótipo, a recuperação no número de ramificação dos neuritos não foi total. Andrade e colaboradores identificaram a presença de TNF em células de Schwann desta linhagem quando infectadas pelo *M. leprae*, assim como em biopsias de pacientes com Hanseníase que apresentaram neurite. Além de TNF, células de Schwann infectadas também são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e IL-8,<sup>94</sup> sugerindo que a inflamação observada na neurite e o efeito observado por nós no modelo *in vitro*, pode ser desencadeada pela estimulação destas citocinas pelo bacilo. Por outro lado outros fatores gerados a partir da infecção pelo *M. leprae* podem ter gerado este perfil de toxicidade aos neurônios, como por exemplo, a liberação de exossomos pelas células infectadas.

Atualmente, uma abordagem que vem crescendo é a identificação de biomarcadores preditivos ou indicadores de patologias, através da identificação de metabólitos produzidos em fluidos biológicos, tecidos ou células. Estes metabólitos são substratos e produtos do metabolismo que dirigem funções celulares essenciais, como a produção de energia, transdução de sinais e apoptose. Patógenos intracelulares precisam obter nutrientes dentro das suas células hospedeiras, manipulando muitas vezes o metabolismo de seu hospedeiro. Em 2013, Beste e colaboradores demonstraram através da técnica de espectrometria de massas baseada na análise espectral do fluxo do carbono 6 da glicose marcado com um isótopo estável (glicose-  $6C^{13}$ ), no qual observaram a sua incorporação nos aminoácidos produzidos através de cada via. Com isso demonstraram que o *Mycobacterium tuberculosis* obtém preferencialmente como fonte de carbono acetil-CoA a partir de lipólise, contribuindo não somente para a identificação de novos alvos para o controle da Tuberculose, mas também para aplicações em outros modelos envolvendo patógenos intracelulares.<sup>95</sup>

Nossos dados gerados a partir da utilização desta mesma metodologia revelaram a forte incorporação de carbonos isotopicamente marcados em aminoácidos essenciais: fenilalanina, treonina e lisina e tirosina, ou seja, não sintetizados por nenhuma célula de mamífero. (Figura 7.12;7.13;7.16). Um dado que se tornou muito interessante, tendo em vista que o sinal foi detectado apenas em células infectadas. Acreditamos que trata-se da utilização por parte da

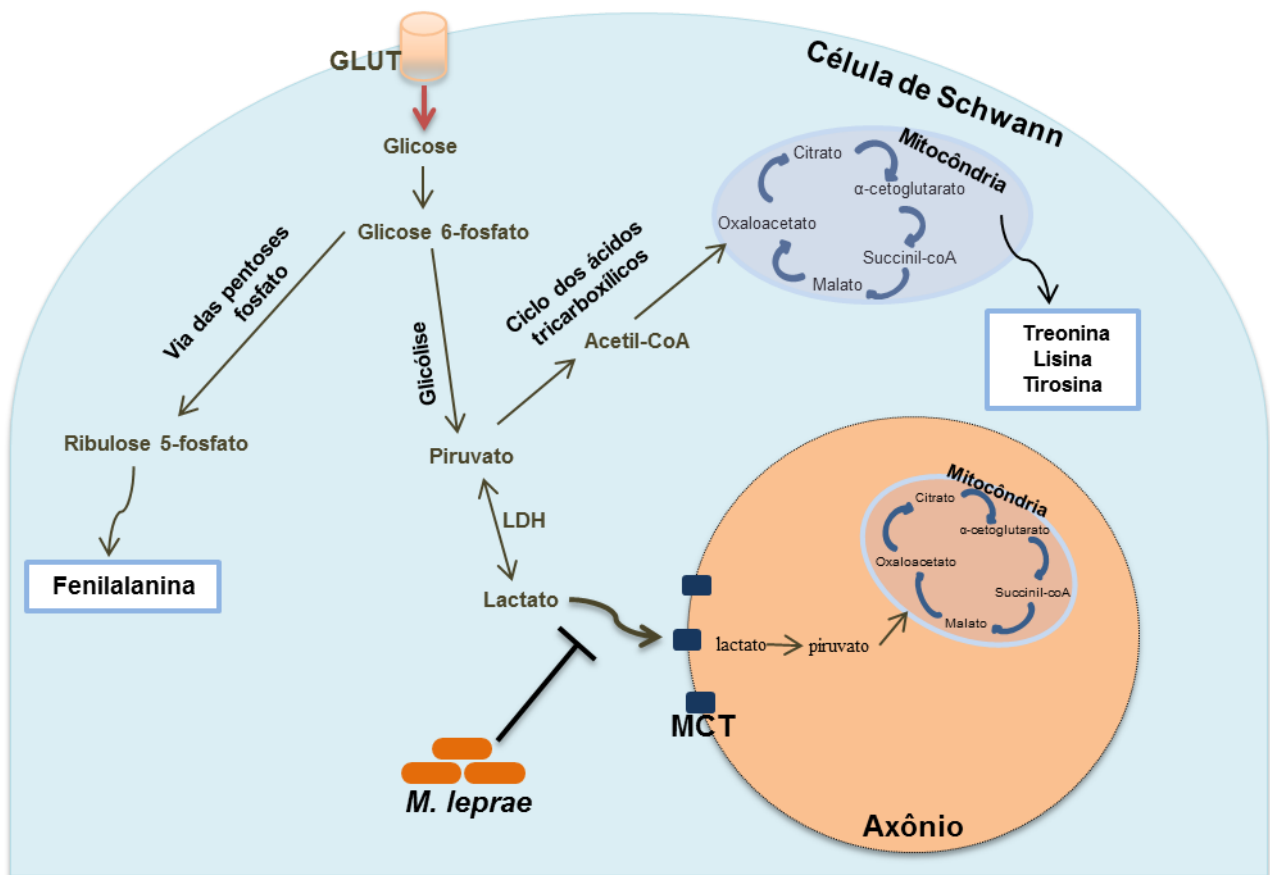
célula infectada de vias biosintéticas do próprio *M. leprae*, que apesar de ter sofrido uma forte redução em seu genoma, manteve íntegras todas as vias de síntese de aminoácidos.<sup>24</sup>

A incorporação de carbono marcado no aminoácido alanina mostrou-se reduzida em células infectadas, sugerindo que a disponibilidade ao piruvato está diminuída na célula de Schwann infectada pelo *M. leprae*, seja por redução em sua síntese, ou por aumento de sua demanda em outras vias, o que pode ser a alternativa mais provável, tendo em vista que estudos anteriores demonstraram grande atividade da citrato liase e subsequente acúmulo de lipídeos durante a infecção desse tipo celular.<sup>72,70</sup>

Foi demonstrado que a infecção por *M. leprae* gera o aumento da expressão de IGF-1.<sup>96</sup> O IGF-1 faz parte do grupo de fatores de crescimento semelhantes à insulina, podendo explicar parte dos efeitos observados na incorporação de carbono a partir de intermediários da gliconeogênese em células infectadas, como os aminoácidos Lisina e Treonina (Figura 7.12 e 7.13). Posteriormente, foi constatado que a infecção induz a proliferação das células de Schwann.<sup>97</sup> Sendo assim, as células em divisão necessitam de uma maior produção de nucleotídeos, coenzimas e outros intermediários que são gerados a partir da via das pentoses. Além de gerar 5-ribose, esta via gera grande quantidade de NADPH quando comparada com outras vias de síntese de poder redutor.

Os aminoácidos fenilalanina e tirosina são sintetizados a partir de uma reação entre a eritrose 4-fosfato e o fosfoenolpiruvato. A partir de nossas investigações sobre a formação destes aminoácidos, identificou-se que os carbonos 7 e 8 fortemente incorporados nestes aminoácidos são provenientes da eritrose 4-fosfato, um metabólito secundário da via das pentoses (figura 7.16). Esse dado corrobora os dados anteriores que mostram a importância da via das pentoses para a sobrevivência do bacilo. Mais importante, ele aponta para o fato do *M. leprae* incorporar e utilizar metabólitos oriundos da via das pentoses, um dado recentemente demonstrado através de marcação isotópica em pata de camundongos nude infectados pelo *M. leprae*, demonstrando que aproximadamente 50% de todos os metabólitos incorporados pelo patógeno são oriundos da via das pentoses.<sup>98</sup> Em conjunto, os dados sugerem que o carbono provindo da glicose parece estar sendo desviado para a rota das pentoses.

Com base nos resultados apresentado estabelecemos um modelo esquemático de modulações que a infecção gera em células de Schwann.



**Figura 6. Modelo proposto de alterações envolvidas durante a infecção pelo *Mycobacterium leprae*.** Ao entrar na célula de Schwann, o bacilo promove alterações no metabolismo metabólicas importantes, tais como a diminuição da liberação de lactato e síntese de aminoácidos considerados essenciais (fenilalanina, treonina, lisina e tirosina), que não são formados por células sem a infecção. Apesar da diminuição de lactato, os seus transportadores celulares (MCT) encontram-se expressos.

Após a sua internalização o *M. leprae* induz o aumento da captação de glicose e consequentemente aumento da atividade da G6PD, o aumento da atividade desta enzima produz NADPH, este poder redutor regenera o sistema glutathiona e assim, promove a sobrevivência do bacilo na célula hospedeira, a partir do combate de radicais livres. A glicose oxidada pela via das pentoses pode gerar gliceraldeído 3-fosfato que alimentará as vias glicolíticas com consequente formação de piruvato. A diminuição de lactato ou exportação dele pode ocasionar consequente diminuição do suporte energético axonal, contribuindo-se para um novo mecanismo de lesão neural na Hanseníase.

## **CONCLUSÃO**

## 9. Conclusão

Com base nos resultados demonstrados neste estudo, podemos concluir que :

- A infecção é capaz de diminuir os níveis de lactato no sobrenadante de células infectadas;
- A infecção *per se* não induz stress oxidativo, pelo contrário, protege a célula hospedeira de futuros insultos oxidantes. Concluimos que esta é uma modulação importante ao sucesso da infecção, dependente da via das pentoses e do sistema glutaciona, uma vez que o inibidor da síntese da mesma, o BSO, foi capaz reverter esse processo e inativar o bacilo;
- O sobrenadante de culturas de Schwann infectadas pelo bacilo possui atividade neurotóxica. A exposição às células de Schwann ao 6-ANAM, droga capaz de inativar o *M. leprae*, reverter à modulação bioenergética e recuperar os níveis de lactato gerados pela célula de Schwann foi capaz de também reverter o efeito neurotóxico.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 10. Referências bibliográficas

1. SCOLLARD DM, ADAMS LB, GILLIS TP, KRAHENBUHL JL, TRUMAN RW, WILLIAMS DL. The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews*. 2006; 19(2): 338-381.
2. OPROMOLLA DVA. Noções de hansenologia. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 1981.
3. TALHARI S. Hanseníase I - In. Hanseníase. 4ª ed. Manaus. 2006; 2: 22- 24.
4. GARCIA JRL. Entre a loucura e a hanseníase: interfaces históricas das práticas e políticas instituídas. *Hansenologia Internationalis*, 2001 [acesso em 10 de junho]
5. HASTINGS R, OPROMOLLA D. Leprosy. In J CK, *Pathology of leprosy*, 1994; p. 266-268.
6. EIDT, LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade* 2004; v.13, n.2, p.76-88.
7. QUEIROZ MS, PUNTEL MA. A endemia hansênica: uma perspectiva multidisciplinar [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1997; 120 p. ISBN 85-85676-33-7.
8. CARNEIRO G. História da dermatologia no Brasil: dados sobre a especialidade e a sociedade científica; edição comemorativa dos 90 anos da fundação da Sociedade Brasileira de Dermatologia. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Dermatologia, 2002.
9. ROTBERG A. A antiga, permanente e poderosa antieducação com a palavra “lepra” e sua frustração através de nova terminologia. 1997; (1) 1: 26-33.



10. ROTBERG A. A antiga, permanente e poderosa anti-educação com a palavra “lepra” e sua frustração através de nova terminologia. 1997; (1) 1: 26-33.
11. BEYENE D, ASEFFA M, HARBOE D, KIDANE M, MACDONALD PR, KLATSER G, BJUNE W, SMITH C. Nasal carriage of Mycobacterium leprae DNA in healthy individuals in Lega Robi village, Ethiopia. *Epidemiology & Infection*. 2003;131:841-848.
12. TRUMAN RW, SINGH P, SHARMA R, BUSSO P, ROUGEMONT J, PANIZ-MONDOLFI A, et al. Probable zoonotic leprosy in the Southern United States. *Journal of Medicine*. 2011; 364(17)1626-33
13. SHARMA R, SINGH P, W.J. LOUGHRY, LOCKHART, W. BARRY INMAN, MALCOLM S. DUTHIE, PENA M, LUIS M, SCOLLARD MD, COLE ST, TRUMAN RW. Zoonotic leprosy in the southeastern united states. *Emerging Infectious Diseases journal*. 2015. Dec; 21 (12):2127-2134.
14. NEUMANN AS, DIAS FA, FERREIRA JS, FONTES ANB, ROSA PS, MACEDO RE, et al. Experimental infection of *Rhodnius prolixus*( Hemiptera, Triatominae) with *Mycobacterium leprae* indicates potencial for leprosy transmission. *Plos one*. 2016
15. HANSEN GA. Causes of leprosy. Translated by Pallamary P. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1955; 23:307-9.
16. HUNTER SW, FUJIWARA T, BRENNAN PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1982; 257:15072-5078
17. HUNTER SW, BRENNAN PJ. Further specific extracellular phenolic glycolipid antigens and a related diacyphthiocerol from *Mycobacterium leprae*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1983; 258: 7556-7562.

18. KHANOLKAR SR, YOUNG DB, BRENNAN PJ, BUCHANAN TM, MCADAM KPWJ. Use of an antigen capture assay for characterization of monoclonal antibodies to mycobacterial lipoarabinomannan. *Journal of Medical Microbiology*. 1989b; 28:157-162.
19. SHEPARD CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot pads of mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 1960; 112: 445-454.
20. TRUMAN RW. Viable *M. leprae* as a research reagent. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteria*. 2001; 69:1–12.
21. COLSTON MJ. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature*. 1976.262:736–741
22. REES RFW, YONG DB. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC. *Leprosy*. 2th Edinbush: Churchil Livingstone; 1994; p. 49-83.
23. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia da hanseníase. 2010.
24. COLE ST, EIGLMEIER K, PARKHILL J, JAMES KD, THOMSON JR, WHEELER RP. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001; 409:1007-1011.
25. SUZUKI K, NAKATA N, BANG PD, ISHII N, MAKINO M. High-level expression of pseudogenes in *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Lett*. 2006;259(2):208–214
26. NAKAMURA K, AKAMA T, BANG PD, et al. Detection of RNA expression from pseudogenes and non-coding genomic regions of *Mycobacterium leprae*. *Microbial Pathogenesis*. 2009;47(3):183–187

27. VISSA DV, BRENNAN PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. *Genome biology*. 2001, 2(8): reviews 1023.1-1023.8.
28. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Weekly epidemiological*. No. 36, 2015, 90, 461–476
29. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Indicadores da hanseníase no Brasil: o que avançamos e o que ainda podemos avançar?*. 2015
30. LAZARO FP, WERNECK RI, MACKERT CC, ET AL. A major gene controls leprosy susceptibility in a hyperendemic isolated population from north of Brazil. *Jornal of Infection Disease*. 2010; 201:1598-1605.
31. RIDLEY DS, JOPLING WH. Classification of leprosy according to immunity—a five-group system. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteria Disease*. 1966; 34:255-273.
32. MIRA MT, ALCAIS A, VAN THUC N, MORAES MO, DI FLUMERI C, THAI VH, ET AL. Susceptibility to leprosy is associated with PARK2 and PACRG. *Nature* 2004; 427(6975):636-40.
33. VEJBAESYA S, MAHAISAVARIYA P, LUANGTRAKOOL P, SERMDUANGPRATEEP C. TNF alpha and NRAMPI polymorphisms in leprosy. *J Med Assoc Thai*. 2007; Jun; 90(6):1188-92.
34. FRANCESCHI DSA, MAZINI PS, RUDNICK CCC, SELL AM, TSUNETO LT, RIBAS ML. Influence of TNF and IL10 gene polymorphisms in the immunopathogenesis of leprosy in the south of Brazil *International Journal of Infectious Diseases*. 2009; 13, 493—498.
35. CARDOSO CC, PEREIRA AC, BRITO-DE-SOUZA VN, DIAS-BAPTISTA IM, MANIERO VC, VENTURI J. IFNG +874 T>A single nucleotide polymorphism is associated with leprosy among Brazilians. *Hum Genet*. 2010; pp. 481–490.
36. MISCH EA, BERRINGTON WR, VARY JC JR, HAWN TR. Leprosy and the human genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010; Dec; 74(4):589–620.

37. WHO. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. Tech Rep Ser. Geneva; 1982; (675):36.
38. PINHEIRO R, SALLES J, SARNO E, SAMPAIO E. Mycobacterium leprae– host-cell interactions and genet. Future Microbiology. 2011; 6(2):217–30.
39. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica. Série A. Normais e Manuais Técnicos. 2009; 819p.
40. NEVES RG. Hanseníase. In: Cucé LC, Festa C Neto. Manual de dermatologia. 2a ed. São Paulo: Atheneu; 2001; p.132-58.
41. BAPTISTA IMFD, SARTORI BCS, TRINO LM. Guia de conduta para a realização do exame baciloscópico. Hansen Int. 2006; 31 (2):39-41.
42. MARTINEZ NA, RIBEIRO-ALVES M, SARNO EM, MORAES MO. Evaluation of qPCR-based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. Neglected Tropical Diseases. 2011; 5 (10):e1354.
43. LIMA EO, MACEDO CS, ESTEVES CZ, OLIVEIRA DN, PESSOLANI MCV, NERY JA, et al. Skin imprinting in sílica plates: a potential diagnostic methodology for leprosy using high-resolution mass spectrometry. Analytical Chemistry. 2015; Apr 7;87(7):3585-92.
44. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy of Leprosy for Control Programmes. Geneva: WHO, Study Group. Technical Report Series 1982; 675.
45. RODRIGUES LC, KERR- PONTES LC, FRIETAS RS, BARRETO MVC, LIMA M. Long lasting BCG protection against leprosy. Vaccine. 2007 Sep 28;25(39-40):6842-4.
46. NELSON DL, COX MM. Princípios de bioquímica de Lehninger. 5ª edição.2011.

47. HALESTRAP AP, PRICE NT. The proton-linked monocarboxylate transporter family: structure, function and regulation. *The Biochemical Journal*, London. 1999; v. 343, no. 2, p. 281-299.
48. HALESTRAP AP, MEREDITH D. The SLC16 gene family – from monocarboxylate transporters (MCTs) to aromatic amino acid transporters and beyond. *European Journal of Physiology*.2004; v. 447, no. 5, p. 619-628.
49. LEITE TC, DA SILVA D, COELHO RG, ZANCAN P, SOLA-PENNA M. Lactate favors the dissociation of skeletal muscle 6-phosphofructo-1-kinase tetramers down-regulating the enzyme and muscle glycolysis. *Biochemical Journal*. 2007; 408: 123-130.
50. SOLA-PENNA M. Metabolic regulation by lactate. *IUBMB Life*.2008. 60: 605-608.
51. VOET D, VOET JG, Pratt CW. *Fundamentos de bioquímica*. 4. ed. Porto Alegre, Artmed, 2013.
52. BUCHAKJIAN A, KORNBLUTH S. The engine driving the ship: metabolic steering of cell proliferation and death. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010; 11(10):715-27
53. KARP G. *Biologia celular e molecular: conceitos e experimentos*. 3ª edição. Editora manole, 2005.
54. WU G. Amino acids: metabolism, functions and nutrition. *Amino acids*, 2009; 37, 1-17.
55. FRANK H, NETTE MD. *Sistema nervosa: medulla espinal e Sistema nervosa periférico- partII*. 2ªedição.
56. APPLGATE E. *Anatomia & fisiologia*. 4ª edição.
57. FISHER MA. Neuropatia periférica. In: Weiner JW, Goetz CG. *Neurologia para o Não-Especialista*. 4a ed. São Paulo: Santos, 2003; pp. 1878.

58. LANDON D, HALL S. The myelinated nerve fiber. In: The peripheral nerve. Ed. D. N.Landon. London. Chapman and Hall, pp. 1-105,1976.
59. HAANPAA M, LOCKWOOD D, HIETAHARJU A. Neuropathic pain in leprosy. *Leprosy Review*. 2004; 75:7–18.
60. MCDOUGALL AC, YUASA YO, HIPPKER J, HIPPKER, H. Atlas of leprosy. 2002
61. VAN BRAKEL WH, ANDERSON AM, WITHINGTON SG, CROFT RP, NICHOLLS PG, RICHARDUS JH, SMITH WC. The prognostic importance of detecting mild sensory impairment in leprosy: a randomized controlled trial. *Leprosy Review*. 2003; 74:300–310.
62. SCOLLARD DM. Endothelial cells and the pathogenesis of lepromatous neuritis: insights from the armadillo model. *Microbes and Infection*. 2000; 2:1835– 1843.
63. SCOLLARD DM, TRUMAN RW, EBENEZER GJ. Mechanisms of nerve injury in Leprosy. *Clinics in Dermatology*. 2015; 33(1)46-54.
64. NG V, ZANAZZI G, TIMPL R, TALTS J, SALZER JL, BRENNAN PJ, RAMBUKKANA A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;103:511–529.
65. JOB CK. Pathology of peripheral nerve lesions in lepromatous leprosy—a light and electron microscopic study. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Dis*. 1975; 39:251–268.
66. CHOUDHURY A, MISTRY NF, ANTIA NH. Blocking of *Mycobacterium leprae* adherence to dissociated Schwann cells by anti mycobacterial antibodies. *Scand. Journal of Immunology*.1989; 30:505–509.
67. RAMBUKKANA A. *Mycobacterium leprae*-induced demyelination: a model for early nerve degeneration. *Current Opinion in Immunology*. 2004; 16:511–518

68. DI PENTA A, MORENO B, REIX S, ET AL. Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation. *PLoS One*. 2013;8:e54722.
69. LEDEEN RW, CHAKRABORTY G. Cytokines, signal transduction, and inflammatory demyelination: review and hypothesis. *Neurochemical Research*. 1998; 23:277-289.
70. MATTOS KA, OLIVEIRA VG, D'ÁVILA H, RODRIGUES LS, PINHEIRO RO, SARNO EM, et al. TRL6-driven lipid droplets in *Mycobacterium leprae*-infected Schwann cells: immunoinflammatory platforms associated with bacterial persistence. *Journal of Immunology*. 2011;1;187(5):2558-58
71. MARQUES MA, BERRÊDO-PINHO M, ROSA TL, PUJARI V, LEMES RM, LERY LM. The Essential Role of Cholesterol Metabolism in the Intracellular Survival of *Mycobacterium leprae* Is Not Coupled to Central Carbon Metabolism and Energy Production. *Journal of Bacteriology*. 2015 Dec; 197(23):3698-707.
72. MEDEIROS RAC. Modulação do metabolismo energético na Hanseníase. 2014. Dissertação (Mestrado) Biologia Celular e Molecular. Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro.
73. BARRES BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and diseases. *Neuron*. 2008; 6;60 (3)430-440:10.1016.
74. JESSEN KJ. Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (2004) 1861–1867.
75. PELLERIN L, MAGISTRETTI PJ. Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994; 91(22)10625-10629.

76. MAGISTRETTI PJ, PELLERIN L. Cellular mechanisms of brain energy metabolism. Relevance to functional brain imaging and to neurodegenerative disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1996; v 777: 380-387.
77. SUSUKI K, RAPHAEL AR, OGAWA Y, STANKEWICH MC, PELES E, TALBOT WS, RASBAND MN. Schwann cell spectrins modulate peripheral nerve myelination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011; 108(19):8009-14.
78. LEE Y, MORRISON BM, LI Y, LENGACHER S, FARAH MH, HOFFMAN PN, LIU Y, TSINGALIA A, JIN L, ZHANG PW, PELLERIN L, MAGISTRETTI PJ, ROTHSTEIN JD. Oligodendroglia metabolically support axons and contribute to neurodegeneration. *Nature* .2012; 487:443–448.
79. SMITH D, PERNET A, HALLETT W, BINGHAM E, MARSDEN P, AMIEL S. Lactate: a preferred fuel for human brain metabolism in vivo. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2003;23: 658–664.
80. VAN HALL G., STROMSTAD M., RASMUSSEN P., JANS O., ZAAR M., GAM C. Blood lactate is an important energy source for the human brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2009; 29: 1121–1129.
81. BARROS L. Metabolic signaling by lactate in the brain. *Trends Neurosci*. 2013; 36: 396–404.
82. BALTAN S. Can lactate serve as an energy substrate for axons in good times and in bad, in sickness and in health? *Metabolism Brain Diseases*. 2015; 30: 25–30.
83. MOSIENKO V, TESCHEMACHER A, KASPAROV S. Is L-lactate a novel signaling molecule in the brain?. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2015; 35: 1069–1075.
84. RAVERA S, BARTOLUCCI M, CALZIA D, ALUIGI MG, RAMOINO P, MORELLI A, PANFOLI I. Tricarboxylic acid cycle-sustained oxidative phosphorylation in isolated myelin vesicles. *Biochimistry*. 2013a; 95:1991–1998.



85. RAVERA S, BARTOLUCCI M, ADRIANO E, GARBATI P, FERRANDO S, RAMOINO P, CALZIA D, MORELLI A, BALESTRINO M, PANFOLI I. Support of nerve conduction by respiring myelin sheath: role of connexons. *Molecular Neurobiology*. 2015a doi: 10.1007/s12035-015-9216-0
86. ANGUS MB, EVANS RD, BLACK J, RANSON BR. Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axons function. *Annals of Neurology*.2012; 72:406-418.
87. BATISTA-SILVA LR, RODRIGUES LS, VIVARINI AC, COSTA FMR, MATTOS KA, NOGUEIRA MRS. Mycobacterium leprae-induced Insulin-like Growth Factor I attenuates antimicrobial mechanisms, promoting bacterial survival in macrophages *Scientific Reports*. 2016; Jun 10; 6:27632.
88. WARBURG O. On the formation of lactic acid with growth. *Biochemistry, Z*, 1983(160), 307–311.
89. ABRANTES AM, SERRA ME, MURTINHO D, GONSALVES AR, BOTELHO MF. An insight into tumoral hypoxia: the radiomarkers and clinical applications. *Oncology Reviews*, 2009; 3(1)3–18.
90. DOMENECH EE, BALOUI A, REPOND X , ROSAFIO K. Distribution of Monocarboxylate Transporters in the Peripheral Nervous System Suggests Putative Roles in Lactate Shuttling and Myelination. *The Journal of Neuroscience*.2015; 35(10):4151–4156.
91. RINHOLM JE, BERGERSEN LH. White matter lactate-does it matter?. *Neuroscience*. 2014; 276: 109-16.
92. RAO VT, KHAN D, JONES RG, NAKAMURA DS, KENNEDY TE, CUI QL, RONE MB. Potential Benefit of the Charge-Stabilized Nanostructure Saline RNS60 for Myelin Maintenance and Repair. *Scientific Reports*. 2016; (25)6:30020.

93. BEIROWSKI B, BABETTO E, GOLDEN J, CHEN Y, YANG K, GROSS RW. Metabolic regulator LKB1 plays a crucial role in Schwann Cell-mediated axon maintenance. *2014*; 17(10) 1351-1361.
94. ANDRADE PR, JARDIM MR, SILVA ACC, MANHAES PS, ANTUNES SLG, VITAL R, et al. Inflammatory Cytokines Are Involved in Focal Demyelination in Leprosy Neuritis. *Journal of neuropathology & Exp Neurology*. 2016; (75)272-283.
95. BESTE DJV, NOH K, NIEDENFUHR S, MENDUM TA, HAWKINS DN, WARD JL, BEALE MH, et al. <sup>13</sup>C flux spectral analysis of host-pathogen metabolism reveals a mixed diet for intracellular mycobacterium tuberculosis. *Cell press*. 2013;20: 1012-1021.
96. RODRIGUES LS, DA SILVA ME, MOREIRA RE, TEMPONE AJ, LOBATO LS, RIBEIRO-RESENDE VT, et al. Mycobacterium leprae induces insulin-like growth factor and promotes survival of Schwann cells upon serum. *Cellular Microbiology*. 2010; 12(1)42-54.
97. TAPINOS N, RAMBUKKANA A. Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk 1/2 via MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from leprosy bacilli. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005; 9193.
98. MIYAMOTO Y, MUKAI T, MATSUOKA M, KAI M, MAEDA Y, MAKINO M. Profiling of Intracellular Metabolites: An Approach to Understanding the Characteristic Physiology of Mycobacterium leprae. *Neglected Tropical Diseases*. 2016; 10(8).