

Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

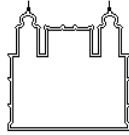
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**Análise do impacto do remodelamento do metabolismo central
da célula de Schwann infectada pelo *Mycobacterium leprae*
sobre neurônios**

KARINA GIRARDI DO CARMO DE VASCONCELOS

Rio de Janeiro

2021



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

KARINA GIRARDI DO CARMO DE VASCONCELOS

**Análise do impacto do remodelamento do metabolismo central
da célula de Schwann infectada pelo *Mycobacterium leprae*
sobre neurônios**

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

Orientador: Prof. Dr. Flavio Alves Lara

Rio de Janeiro

2021

Girardi, Karina.

Análise do impacto do remodelamento do metabolismo central da célula de Schwann infectada pelo *Mycobacterium leprae* sobre neurônios / Karina Girardi. - Rio de Janeiro, 2021.

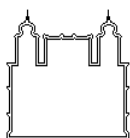
119 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: Flavio Alves Lara.

Bibliografia: f. 1-44

1. Hanseníase. 2. Células de Schwann. 3. Neuropatia hansênica. 4. *Mycobacterium leprae*. I. Título.



Ministério da Saúde
Fiocruz
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Karina Girardi Do Carmo De Vasconcelos

Análise do impacto do remodelamento do metabolismo central da
célula de Schwann infectada pelo *Mycobacterium leprae* sobre
neurônios

ORIENTADOR: Dr. Flavio Alves Lara

Aprovada em: __/__/__

EXAMINADORES: Prof. Dra. Clarissa M. Maya-Monteiro (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Mauro Sola-Penna (ICB-UFRJ)

Prof. Dra. Rosalia Mendez-Otero (IBCCF-UFRJ)

Prof. Dra. Verônica Schmitz Pereira (IOC-Fiocruz)

Prof. Dr. Victor Túlio Ribeiro Resende (IBCCF-UFRJ)

Rio de Janeiro, 31 de março de 2021

“Between courage and comfort, choose courage”

Brene Brown

Agradecimentos

Nesse momento difícil da ciência brasileira nunca foi tão importante a união a comunidade científica. A ciência, em todos os seus âmbitos, serve a humanidade com conhecimento, educação e melhora da qualidade de vida. Ciência se faz em conjunto e, por isso, deixo aqui meus sinceros agradecimentos às pessoas que estiveram comigo durante a trajetória até aqui.

Ao Dr. Flávio Alves Lara, meu sincero agradecimento e respeito. Sua visão ampla da ciência, entusiasmo, coragem em avançar em diferentes frentes de investigação e parceria auxiliaram minha formação e amadurecimento nesses quase 10 anos. Serei sempre grata pela oportunidade e confiança.

À Dr. Rychelle Medeiros, minha primeira orientadora da bancada, do dia a dia. Cheguei sem experiência alguma e com toda paciência ela me ensinou cultura de células, lá no início em 2013. Ela segue comigo até hoje, tenho muita sorte em tê-la por perto desde o início, sua amizade, perseverança e senso de humor jamais serão esquecidos. Obrigada por tanto!

Ao Bruno Mietto, meu sincero agradecimento! Jamais esqueci toda a sua ajuda na seleção de doutorado. Você foi fundamental para que conseguíssemos os ensaios do cultivo de neurônios, obrigada por compartilhar o conhecimento comigo. Tenho muito gratidão e respeito por você.

Agradeço também aos demais integrantes do laboratório de Microbiologia Celular (Lamicel), amigos que ultrapassam a fronteira do trabalho. Em especial aos meus amigos queridos Débora Santos, Thabatta Leal, Fabrício da Mota, Sabrina Alves, Diego Souza, André Alves, João Pedro e Mayara Mattos, Antônio Marcos e Plínio Marcos. Além dos integrantes agora pouco mais distantes fisicamente, mas não menos importantes Robertha Lemes, Arthur Neumann, Leonardo Ribeiro e Chyntia Díaz. Foi um grande privilégio ter o contato com pessoas tão especiais, obrigada a todos por cada viagem, passeio, semana de *M. leprae* e amizade!

Às pesquisadoras do Lamicel Maria Cristina Pessolani, Márcia Berredo, Cristiana Macedo e Letícia Lery, toda a minha gratidão por terem me recebido no laboratório e me auxiliado nesses anos. Tenho vocês como uma grande inspiração, obrigada.

À banca examinadora, obrigada por terem aceitado o convite e por compartilharem seus conhecimentos para a discussão do trabalho. Agradeço igualmente a revisora, pela paciência e auxílio nos ajustes do documento.

À coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pela bolsa de estudos fornecida nesses anos.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, pelo acesso ao conhecimento oferecido nas diversas disciplinas ao longo dos quatro anos de doutorado e dois de mestrado, o que me remete a frase do início dos agradecimentos: ciência se faz em conjunto. Orgulho-me de ter feito parte do corpo discente da Fiocruz.

Sumário

Lista de abreviatura	ix
Lista de figura	xii
Resumo	xv
Abstract	xvi
Introdução	1
1 Sistema nervoso periférico: aspectos principais	1
1.2 Estrutura do nervo periférico	3
1.3 Interdependência axônio-glia	12
1.3.1 Interação axônio-glia durante a diferenciação das células de Schwann	12
1.3.2 Plasticidade da célula de Schwann após a lesão do nervo	14
1.3.3 Acoplamento energético axônio-glia	16
1.3.3.1 Visão geral do metabolismo de carbono nas células eucarióticas	16
1.3.3.2 Metabolismo energético axônio-glia	24
1.4 Hanseníase	28
1.4.1 Aspectos gerais da doença e epidemiologia	28
1.4.2 <i>Mycobacterium leprae</i>	30
1.4.3 Manifestações clínicas	33
1.4.3.1 Sinais e sintomas dermatológicos	33
1.4.3.2 Neuropatia hansênica	34
1.4.4 Diagnóstico e tratamento	37
1.5 Mecanismos envolvidos na lesão neural	38
2. Justificativa	45
3. Objetivo	46
3.1 Objetivo principal	46
3.2 Objetivos específicos	46
4. Materiais e métodos	47
4.1 Cultivo de células de linhagem	47
4.2 Purificação e cultivo de neurônios primários	47
4.3 Neurônios primários tratados com sobrenadante de Schwann	49
4.4. Obtenção de micobactérias	49

4.4.1	<i>Mycobacterium leprae</i>	49
4.4.2	<i>Mycobacterium bovis</i>	49
4.5	Dosagem de lactato do sobrenadante celular	50
4.6	Ensaio de viabilidade celular por MTT	50
4.7	Imunocitoquímica	51
4.7.1	Neurônios primários	51
4.7.2	Marcação de células com bodipy	51
4.8	Marcação de células de Schwann com carbono 13 (¹³ C)	52
4.9	Extração de aminoácidos ¹³ C por hidrólise ácida	52
4.10	Incubação de células com lactato	53
4.10.1	Marcação de células com L-lactato ¹⁴ C	53
4.11	Extração lipídica pelo método de Bligh & Dyer	53
4.12	Cromatografia em camada fina de lipídeos radioativos ¹⁴ C	54
4.13	Avaliação de fluorescência por Microscopia	55
4.14	Dosagem de proteína	55
4.15	Eletroforese unidimensional e coloração por nitrato de prata e coomassie	55
4.16	Revestimento de Beads com PGL-1	56
4.17	Análises do metabolismo central através de fluorescência de células vivas (NBDG e TMRM)	56
4.18	Fracionamento do sobrenadante celular	56
4.19	Purificação de exossomos do sobrenadante celular	57
4.20	Análise estatística	57
5.	Resultados	58
5.1	Avaliação da rota do carbono da glicose até o anabolismo de aminoácidos	58
5.2	Análise do impacto das alterações do metabolismo glicolítico de células de Schwann sobre neurônios	62
5.3	Investigação do desvio de lactato nas células de Schwann infectadas pelo <i>M. leprae</i>	69
5.4	Avaliação da toxicidade de lipídios presentes no sobrenadante de células de Schwann	72
5.5	Análise da capacidade do <i>M. leprae</i> morto em gerar o efeito neurotóxico no sobrenadante	78

6.	Discussão	85
7.	Conclusão	94
8.	Referências bibliográficas	95
8.	Anexo	112

Lista de abreviações

ACK	Cloreto de Amônio-Potássio
ADP	Adenosina difosfato
AG	Arabinogalactana
AIS	Segmento inicial do axônio
AMPK	Proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina
AP2 α	“Activator protein 2 α ”
ATP	Adenosina trifosfato
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BACE	Proteína associada à membrana β -secretase 1
BBB	“Blood brain barrier”
BB	“Borderline borderline”
BDNF	“Brain-derived neurotrophic factor”
BNB	“Blood nerve barrier”
BT	“Borderline” tuberculóide
CCCP	“Carbonyl Cyanide m Chlorophenyl Hydrazone”
DLL 1	“Notch Jagged 1/2”
DLL 2	“Notch Jagged 1/3”
DRG	“Dorsal root ganglia”
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ErbB2/ ErbB	Receptor de tirosina quinase
FAD	Dinucleotídeo de flavina-adenina
GDNF	“Glial cell-derived neurotrophic fator”
G6PD	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GLUT	Transportador de glicose
GSH	Glutathiona reduzida
Hes1	“Transcription factor HES-1”
Hes5	“Transcription factor HES-5”

Hey1 1”	“Hairy/ enhancer of split related with YRPW motif protein
HIF1 α	“Hypoxia-inducible factor”
IB	Índice baciloscópico
ImSC	Célula de Schwann imatura
IL-6	Interleucina 6
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-5	Interleucina 5
LAM	Lipoarabinomanana
LIF	“Leukemia inhibitory factor”
LKB1	Serina/treonina quinase
LL	Polo lepromatoso
LM	Lipomanana
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MAG	Glicoproteína associada à mielina
MBP	Proteína básica de mielina
MCT	Transportador de monocarboxilato
MPZ	Proteína zero de mielina
mTOR	“Target of rapamycin”
MTT bromide	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NBDG D-glucose”	“2-[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-
NT3	Neurotrofina 3
NGF	Fator de crescimento neuronal
NRG	Neuregulina
NRG1- III	Neuregulina 1 do tipo III
NMDA	“N-methyl-D-aspartate receptor”
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase

PEES	Solução de penicilina-estreptomicina
PDIM	Ftiocerol dimicocerosato
PFA	Paraformaldeído
PGL-1	Glicolípido fenólico 1
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PPP	Via das pentoses fosfato
PIM	Fosfatidilinositol manosídeo
PQT	Poliquimioterapia
ROS	“Reactive oxygen species”
SAG	Glicoproteína de membrana
SCp	Célula de Schwann precursora
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SOX10	“SRY-Box Transcription Factor 10”
RBPJ	“Recombination signal-binding protein for immunoglobulin”
ROS	“Reactive oxygen species”
TACE/ ADAM 17	“A disintegrin and metallopeptidase”
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TFAM	“Mitochondrial transcription factor A”
TMM	Monomicolato de trealose
TT	Polo tuberculóide
TMTM	“Tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate”

Lista de figuras

Figura 1. Integração entre os componentes do SNC e os nervos periféricos	4
Figura 2. Formação da bainha de mielina sobre o axônio	6
Figura 3. Composição da bainha de mielina do SNP	7
Figura 4. Organização da bainha de mielina em torno do axônio	9
Figura 5. Principais componentes da estrutura do fascículo	10
Figura 6. Visão geral da estrutura do nervo periférico	11
Figura 7. Interação axônio-glia durante o desenvolvimento do SNP	13
Figura 8. Diferenças no comprimento dos tipos de célula de Schwann no nervo	15
Figura 9. Resumo da importância das células de Schwann após a lesão	16
Figura 10. Sequência de eventos da glicólise	18
Figura 11. Sequência de reações do ciclo do ácido tricarboxílico	20
Figura 12. Metabolismo oxidativo de células diferenciadas e cancerígenas	21
Figura 13. Via das pentoses fosfato e suas conexões com a glicólise	22
Figura 14. Resumo das principais vias do metabolismo de carbono nas células	23
Figura 15. Acoplamento energético axônio-glia no sistema nervoso central	25
Figura 16. Distribuição dos transportadores de glicose (GLUT) e lactato (MCT) no sistema nervoso periférico	26
Figura 17. Adaptações metabólicas das células de Schwann após a lesão axonal	27
Figura 18. Mapa dos novos casos de hanseníase no mundo em 2018	29
Figura 19. Imagem do local da inoculação de <i>M. leprae</i>	30
Figura 20. Principais componentes do envelope celular do <i>M. leprae</i>	31
Figura 21. Formas clínicas da Hanseníase	34
Figura 22. Localização dos principais nervos afetados na hanseníase	35
Figura 23. Sinais clínicos que indicam o envolvimento dos nervos na hanseníase	36
Figura 24. Incapacidades irreversíveis geradas pela doença	37
Figura 25. Interação do <i>M. leprae</i> com componentes da lâmina basal da célula de Schwann	40
Figura 26. Sinalização celular proposta por desencadear a desmielinização das células de Schwann expostas ao <i>M. leprae</i>	41
Figura 27. Modulação do metabolismo glicolítico de células de Schwann infectadas pelo <i>M. leprae</i>	43

Figura 28. Panorama da incorporação de ^{13}C nos aminoácidos de células pré-incubadas com glicose $^{13}\text{C}_6$	58
Figura 29. Panorama da incorporação de ^{13}C nos aminoácidos proteinogênicos	60
Figura 30. Comparação do perfil de isotopômeros nos aminoácidos	61
Figura 31. Perfil de isotopômeros ^{13}C no aminoácido fenilalanina no <i>M. leprae</i> intracelular	62
Figura 32. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS suplementados com sobrenadante de células de Schwann	63
Figura 33. Dosagem de lactato do sobrenadante de células de Schwann	64
Figura 34. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS suplementados com sobrenadante de células de Schwann tratadas com 6ANAM	65
Figura 35. Percentual de células marcadas com neurofilamento e ramificadas	66
Figura 36. Neurônios primários suplementados com sobrenadante de células de Schwann	67
Figura 37. Perfil da ramificação e extensão dos neurônios primários suplementados com sobrenadante de células de Schwann	68
Figura 38. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS suplementados com l-lactato	69
Figura 39. Análise da abundância de C^{14} em lipídios intracelulares em células de Schwann infectadas pelo <i>M. leprae</i>	70
Figura 40. Análise do acúmulo lipídico em células de Schwann controle e infectada pelo <i>M. leprae</i> após a adição de lactato	71
Figura 41. Análise da abundância de C^{14} em lipídios do sobrenadante de células de Schwann infectadas pelo <i>M. leprae</i>	72
Figura 42. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS suplementados com o produto da extração lipídica do sobrenadante de células de Schwann	73
Figura 43. Perfil proteico do sobrenadante de células de Schwann	74
Figura 44. Perfil da morfologia de neurônios primários suplementados com as frações geradas a partir do sobrenadante de células de Schwann infectado	75
Figura 45. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS após a adição do sobrenadante fracionado	76
Figura 46. Tratamento da fração 41 e observação de seu efeito citotóxico em neurônios de linhagem	77
Figura 47. Viabilidade de neurônios de linhagem suplementados com exossomos	78

Figura 48. Viabilidade neuronal após o estímulo com <i>M. leprae</i> morto por irradiação e rifampicina_____	79
Figura 49. Captação de glicose de células de Schwann expostas ao PGL-1_____	80
Figura 50. Avaliação do potencial elétrico mitocondrial após a exposição das células de Schwann ao PGL-1_____	81
Figura 51. Concentração de lactato do sobrenadante de células de Schwann estimuladas com BCG-PGL1_____	82
Figura 52. Análise da viabilidade de neurônios de linhagem após adição de sobrenadante de células de Schwann estimuladas com BCG-PGL-1_____	83

Resumo

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium leprae*. Conhecida por afetar o sistema nervoso periférico, a doença causa sintomas dermatoneurológicos nos pacientes, como lesões com hipoalgesia, podendo evoluir a danos neurais mais graves. No Brasil foram registrados em 2018 2.109 casos de incapacidade física resultantes da doença, o que lamentavelmente ainda parece ser fruto de subnotificação. O acometimento neural observado na doença tem sido atribuído à predileção do *M. leprae* em infectar células de Schwann e macrófagos. Na literatura, cada vez mais é atribuído às células da glia o suporte energético axonal e seu desequilíbrio associado a um fator agravante de doenças neurodegenerativas. Previamente demonstramos que o *M. leprae* é capaz de promover alterações no metabolismo oxidativo das células de Schwann *in vitro*, como o aumento na captação da glicose, diminuição do metabolismo fermentativo e do potencial elétrico mitocondrial. Adicionalmente, axônios com mitocôndrias inchadas foram observados em biópsias de nervos de pacientes com hanseníase. No presente trabalho, foi investigado a rota do carbono 6 de glicose $^{13}\text{C}_6$ ao longo das vias de síntese de aminoácidos, confirmando seu desvio para a via das pentoses. Além disso, observamos que o *M. leprae* utiliza a glicose da célula hospedeira como fonte de carbono para a biossíntese dos seus aminoácidos. A incubação do bacilo em meio axênico com $^{13}\text{C}_6$ é incapaz de promover tal processo observado com as células hospedeiras. O impacto deste desvio metabólico da célula glial sobre a fisiologia neuronal foi avaliado a partir da incubação de meio condicionado de células de Schwann infectadas, em cultura de neurônios primários do gânglio da raiz dorsal e em neurônios de linhagem. O tratamento afetou drasticamente a morfologia e a viabilidade dos neurônios. Ainda, observamos a partir de lactato C^{14} que o lactato nas células de Schwann é desviado para a síntese lipídica, contribuindo para a exacerbação na formação dos corpúsculos lipídicos durante a infecção. Lipídios marcados com C^{14} também foram observados no sobrenadante das células e, interessantemente, neurônios expostos a estes sobrenadantes diminuem sua viabilidade. O efeito neurotóxico é atenuado pela inibição farmacológica da via das pentoses fosfato. Acreditamos que o efeito neuro-protetor observado durante a inibição da via das pentoses ocorra a partir da diminuição da síntese lipídica e subsequente recuperação metabólica da célula de Schwann infectada. Coletivamente, nossos resultados sugerem que as alterações no metabolismo das células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* podem estar correlacionadas com o dano neural na hanseníase, representando um mecanismo até o momento não explorado.

Abstract

Leprosy is an infectious disease caused by the intracellular pathogen *Mycobacterium leprae*. Known for affecting the peripheral nervous system, the disease causes dermato-neurological symptoms, including hypoalgesia lesion, which can progress to severe neural damage. In Brazil, 2.109 cases of physical disability resulting from the disease were registered in 2018. Unfortunately, the number still seems to be the result of underreporting cases. The neural involvement observed in leprosy patients has been related to the ability of *M. leprae* to infect Schwann cells and macrophages. Recent studies have been increasingly associated glial cells to support axonal metabolism and its unbalance was associated with neurodegenerative diseases. Previously, we demonstrated that *M. leprae* was able to subvert Schwann cell energy metabolism, including the increase of glucose uptake accompanied by a decrease in lactate release and mitochondrial membrane potential. Additionally, mitochondrial swelling was observed in axons from nerve biopsies. In the present study, we observed the route of carbon 6 from glucose ($^{13}\text{C}_6$) along the amino acid synthesis pathways, confirming its deviation to pentoses phosphate pathway. Furthermore, we observed that *M. leprae* uses glucose from their host cells as a carbon source for its amino acid biosynthesis. Using axenic culture labeled with $^{13}\text{C}_6$ it was found that *M. leprae* is unable to biosynthesis its amino acids such as the process observed with host cells. The metabolic impact of glucose shunt in infected Schwann cells on neuronal cells was evaluated through the addition of Schwann conditioned medium in primary sensory neurons and neuronal cell line. The treatment of conditioned media drastically affected the morphology and viability of neurons. Moreover, verify using lactate C^{14} that lactate in infected Schwann cells is diverted to lipid synthesis, contributing to the exacerbation in lipid droplet biogenesis during infection. C^{14} -labeled lipids have also been found in cell supernatants and, interestingly, neurons exposed to these supernatants decrease their viability. The neurotoxic effect is attenuated by the pharmacological inhibition of the pentose phosphate pathway. Taken together, we believe that the neuroprotective effect observed during the inhibition of the pentose pathway occurs from the decrease of lipid synthesis and subsequent metabolic recovery of the infected Schwann cell. Collectively, our results suggest that subversion of Schwann cell energy metabolism by *M. leprae* can be correlated with neural damage in leprosy, representing an unknown mechanism in the disease.

1. Introdução

1.1 Sistema nervoso periférico: aspectos gerais

O sistema nervoso é responsável por reger a atividade de todos os outros sistemas presentes nos animais bilaterais. Existe uma divisão estrutural do sistema nervoso nos vertebrados em: sistema nervoso central (SNC), formado pelo encéfalo (cérebro, cerebelo, mesencéfalo, bulbo e tálamo) e medula espinal; e em sistema nervoso periférico (SNP), constituído por gânglios e nervos (Miller & Zachary, 2020). Os nervos são estruturas tubulares projetadas em sua maioria a partir da medula espinal, com destino a todas as regiões periféricas do corpo. Além disso, o SNP é classificado conforme a sua função em motor e sensorial. A fibra sensorial conduz informações dos órgãos sensoriais e músculos ao SNC enquanto a fibra motora é encarregada da transmissão de comandos motores do SNC aos músculos e glândulas (Feldman et al., 2017; Miller & Zachary, 2020; Zeisel et al., 2018).

Doenças que afetam o microambiente neural são comuns e são coletivamente denominadas de neuropatias periféricas. Estima-se que 2-7% da população mundial seja afetada por algum tipo de neuropatia. As causas mais conhecidas incluem trauma, diabetes, agentes infecciosos, alcoolismo, distúrbios genéticos e autoimunes. Todavia, independente da causa, os nervos são acometidos principalmente pela degeneração axonal e desmielinização (Callaghan et al., 2012). Ao contrapor com o SNC, o SNP apresenta certas particularidades que o torna mais frágil às lesões.

A medula e o encéfalo são protegidos por ossos do crânio e da coluna vertebral, respectivamente. A maioria dos nervos, por sua vez, não apresenta proteção óssea e estão localizados superficialmente no corpo, aumentando o risco de lesões traumáticas (Carvalho et al., 2019; Zilic et al., 2015). Outra diferença observada entre os sistemas está na barreira celular entorno dos capilares sanguíneos. Os capilares presentes no endoneuro são revestidos por células endoteliais e, em conjunto com o próprio endoneuro funcionam como uma barreira física à passagem de íons e macromoléculas vindas do sangue, a barreira sangue-nervo (do inglês “blood-nerve barrier-BNB”) (Rechthand & Rapoport, 1987; Reinhold & Rittner, 2020).

Contudo, a barreira hemoencefálica (do inglês “blood brain barrier- BBB”) presente no SNC apresenta uma camada adicional formada por astrócitos chamada glia perivascular (Langert & Brey, 2018). Essa diferença sugere que em comparação

ao SNC, o SNP seja mais susceptível à passagem de patógenos, no entanto, o estudo *in vivo* feito por Poduslo e col. (1994) demonstrou que a impermeabilidade entre as barreiras a moléculas pequenas parece similar. O que se sabe é que existem regiões do sistema nervoso periférico ausente de barreira sangue-nervo. Nesse contexto, os corpos celulares de neurônios sensoriais presentes nos gânglios são mais vulneráveis à entrada de substâncias, por se localizarem na região próxima ao tronco nervoso (Abram et al., 2006).

De modo geral, os nervos são mais permeáveis à entrada de linfócitos T e macrófagos (Kanda, 2013). Após a lesão neural, células de Schwann e macrófagos residentes liberam citocinas que atraem mais macrófagos ao sítio da lesão para promover a fagocitose dos debris axonais e da bainha de mielina, tornando o microambiente neural inflamado (Kristijan R. Jessen & Mirsky, 2019b). A inflamação crônica pode desencadear quadros de fibrose, em que as células residentes são substituídas por matriz extracelular, quadro observado em infecções persistentes como no caso da hanseníase (Antunes et al., 2019). Em suma, apesar de o SNP apresentar um programa de regeneração nervosa, a recuperação funcional da fibra nervosa é um processo complexo, demorado e susceptível a erros, como o redirecionamento axonal, causando a inervação incorreta (Kristijan R. Jessen & Mirsky, 2019b).

O grupo descrito de lesões não traumáticas é bastante heterogêneo, entre eles, a que possui maior incidência no mundo é a neuropatia provocada pelo diabetes (Yagihashi et al., 2011). É crescente o número de estudos que relacionam a neuropatia diabética à disfunções metabólicas nas células de Schwann (Feldman et al., 2017). No sistema nervoso os axônios estão em contato íntimo com as células gliais, que além da formação da bainha de mielina fornecem suporte trófico e energético. A importância do acoplamento energético entre axônio-glia tem sido relatada em modelos *in vitro* e *in vivo* (Bouçanova & Chrast, 2020).

No nervo, a célula de Schwann fornece lactato e piruvato ao axônio a partir de transportadores específicos (Brown et al., 2012; Domenech-Estevez et al., 2015). Alterações de moléculas regulatórias de metabolismo central, como na serina treonina quinase LKB1, ou a inibição do suprimento metabólico da célula de Schwann, levam à desmielinização e degeneração axonal (Beirowski et al., 2014). Nesse contexto, o *M. leprae*, que é um patógeno que apresenta tropismo por células de Schwann, é capaz de modular o metabolismo glicolítico da célula de Schwann (Medeiros et al.,

2016). O presente trabalho parte da premissa que mudanças no metabolismo da célula de Schwann podem representar o primeiro insulto na cadeia de eventos que vai por fim resultar na neuropatia hansênica, sendo necessária sua compreensão e reversão farmacológica.

1.2 Estrutura do nervo periférico

O tecido nervoso tem como principais componentes as células neuronais e gliais. Os neurônios são células altamente especializadas responsáveis pela transmissão da informação pelo corpo sob a forma de impulso elétrico. Embora exista uma diversidade de células neuronais variando em forma e tamanho, a maioria dos neurônios consiste em três partes distintas: corpo celular, dendritos e axônio (Masland, 2004).

O corpo celular ou soma é uma região arredondada que contém o núcleo celular, a partir dele se estendem múltiplas ramificações chamadas de dendritos e um processo, o axônio. O axônio também é referido como fibra nervosa, sendo caracterizado por seu longo comprimento. Em humanos, o axônio de um único neurônio pode atingir cerca 1 metro de distância de seu corpo celular até o sítio alvo. O soma é o centro do metabolismo neuronal. Além do núcleo celular, concentra a maioria das organelas citoplasmáticas, como o retículo endoplasmático e o aparelho de golgi. Essa biomassa longínqua que é o axônio é suportada pelas células de Schwann e pelo transporte axonal de organelas e vesículas, mantido pela organização dos microtúbulos do citoesqueleto axonal (Beirowski, 2013; Hollenbeck & Saxton, 2005; A. Saito & Cavalli, 2016).

O neurônio é classificado de acordo com a sua função em motor ou sensitivo. O axônio aferente do neurônio sensitivo transporta informações de receptores sensoriais periféricos para o sistema nervoso central. De acordo com o tipo de resposta detectada, o neurônio sensorial é descrito como nociceptivo (dor e temperatura), mecanoceptivo (toque) e proprioceptivo (posição/movimento). Os corpos celulares desses neurônios permanecem localizados em uma estrutura encapsulada conhecida como gânglio da raiz dorsal (do inglês “dorsal root ganglia-DRG”), a partir da qual seus axônios são projetados. As terminações axonais dos neurônios nociceptivo e mecanoceptivo são observadas na pele, enquanto dos mecanoceptivo formam estruturas fusiformes conhecidas como fuso muscular, localizadas no interior dos músculos. O DRG está presente bilateralmente nos vertebrados dentro de estruturas ósseas conhecidas como neuroforames, abrigando além dos corpos celulares

neurônais, uma população de células gliais satélites (Esposito et al., 2019; Tamara & Anderson, 2003).

Em contrapartida, axônios eferentes de neurônios motores são responsáveis pela transmissão da informação do sistema nervoso central para músculos e glândulas. O corpo celular desses neurônios se mantém dentro do corno ventral da medula espinal, protegido pela cavidade vertebral (Esposito et al., 2019). Isso ocorre, pois apesar da cavidade craniana e vertebral serem elementos do SNC, não existe uma linha divisória entre os sistemas, mas particularidades observadas em cada um. O resumo da localização e função dos neurônios sensitivos (nociceptivo, mecanoceptivo e propioceptivo) e motores são exibidos abaixo (figura1).

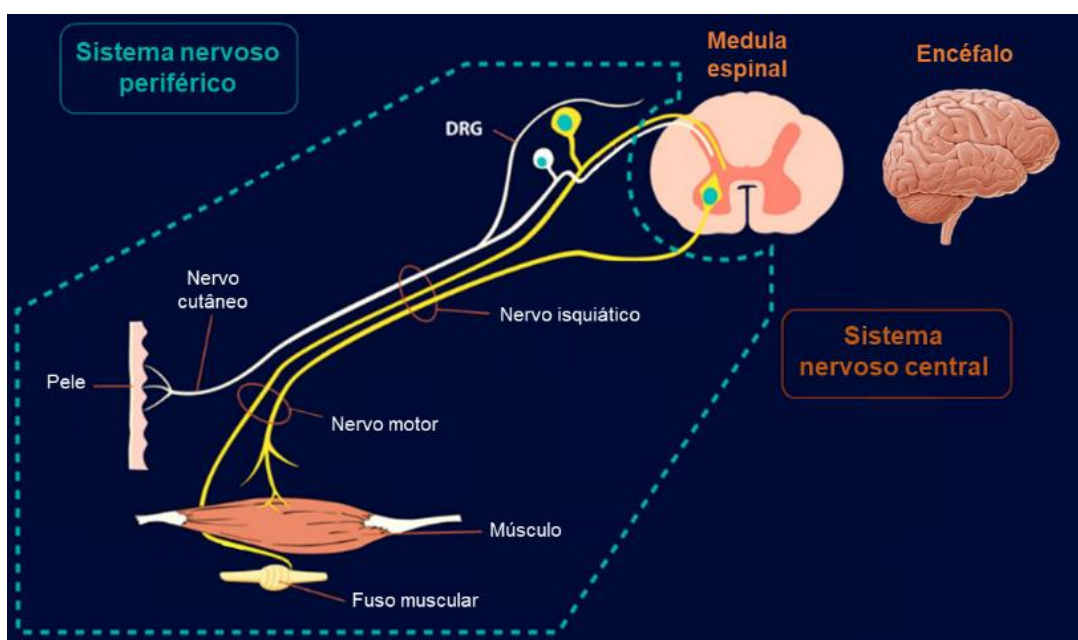


Figura 1. Integração entre os componentes do SNC e os nervos periféricos. Em seu interior, os nervos podem conter fibras aferentes ou eferentes. No caso do nervo isquiático, são observados os dois tipos de fibras. Os terminais axonais de neurônios sensoriais estão presentes na pele (nociceptivo e mecanoceptivo-branco) e no músculo (proprioceptivo-amarelo), conduzem informações desses receptores ao SNC. A resposta do SNC se dá através do neurônio motor (amarelo), com seus terminais axonais no músculo, promovendo contração muscular ou sua inibição. Imagem modificada de Samuel & Rambukkana (2018).

Conforme mencionado, os axônios atingem longas distâncias do corpo celular, principal região responsáveis pela síntese dos componentes orgânicos. Apesar do transporte de vesículas, organelas como a mitocôndria e até mesmo RNA mensageiro (RNAm) a partir do corpo celular, os axônios encontram-se intimamente associados a células gliais para apoiar sua homeostasia (Lopez-Verrilli & Court, 2012). O termo “glia” é originário do grego “cola” e foi introduzido por Rudolf Virchow em 1856, graças

à observação dessas células revestindo as fibras nervosas. Por muito tempo a glia foi considerada acessória, porém, conforme o avanço das técnicas de coloração foi possível identificar diferentes tipos celulares presentes nesse grupo e verificar suas funções (Butt & Verkhratsky, 2018).

Diferente do observado no SNC, o qual apresenta como células da glia os astrócitos, oligodendrócitos e micróglia, o SNP exhibe as células de Schwann, células satélites, glia entérica, células do revestimento olfatório e teloglia. As células satélites cobrem os corpos celulares dos neurônios dos gânglios da raiz dorsal enquanto os axônios a partir dos troncos nervosos são revestidos pelas células de Schwann (Kristjan R. Jessen & Mirsky, 2005). Outras células gliais do SNP menos citadas são as células do revestimento olfatório, uma vez que são restritas ao revestimento dos axônios do nervo olfatório. Já a glia entérica, a qual compõe uma parte do SNP responsável pelo movimento involuntário dos órgãos, forma o sistema nervoso autônomo. Finalmente, os terminais axonais na junção neuromuscular são envoltos por glia terminal também chamada de teloglia (Kristjan R. Jessen & Mirsky, 2005).

Não obstante, a célula de Schwann é a principal célula glial da periferia, uma vez que sua interação auxilia o axônio na propagação do impulso nervoso, fornece fatores tróficos e, graças a sua plasticidade, atua na regeneração do nervo em caso de lesão (Boerboom et al., 2017). Nesse momento a importância da Schwann na organização do nervo será explorada, enquanto seus demais papéis serão abordados nos próximos tópicos.

No nervo adulto existem duas populações de células de Schwann, descritas como mielínicas e amielínicas. A célula de Schwann mielínica é responsável pela formação da bainha de mielina, uma camada multilamelar estabelecida a partir do remodelamento de sua membrana plasmática. Inicialmente, a célula de Schwann circunda o axônio “abraçando-o” e as duas extremidades da sua membrana plasmática se aproximam e fundem, formando o mesaxônio. À medida que o mesaxônio se alonga e se espiraliza sobre o axônio, os folhetos internos da membrana das células de Schwann se encontram devido ao deslocamento do citoplasma, formando a linha densa principal (figura 2). Enquanto os folhetos externos apostos formam a linha intraperíodo. O remodelamento da célula Schwann durante a mielinização se dá de forma admirável, após esse processo a área da superfície

celular pode ser até 2000 vezes maior que a de células epiteliais (Kidd et al., 2013; Rasband & Macklin, 2012).

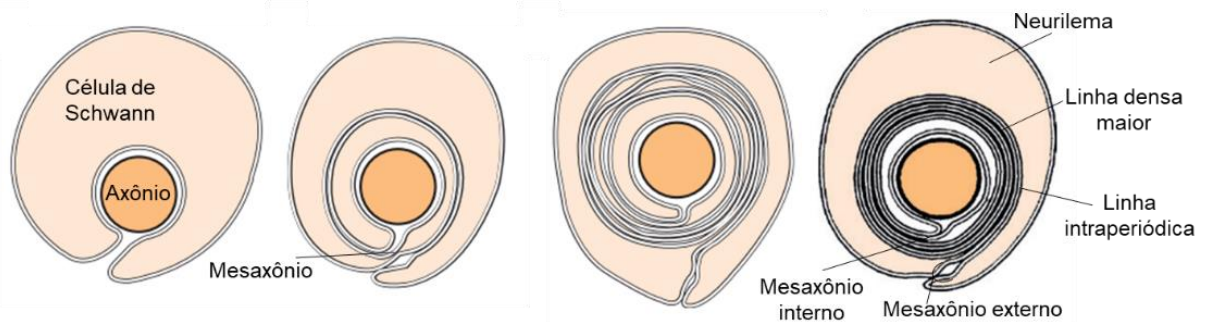


Figura 2. Formação da bainha de mielina sobre o axônio. Da esquerda para a direita, a célula de Schwann envolve o axônio, as duas extremidades da sua membrana externa se unem formando a membrana dupla mesaxônio. O mesaxônio se estende e o citoplasma da Schwann vai sendo espremido gerando o neurilema, região onde é observado o núcleo da célula glial. (Rasband & Macklin, 2012).

Em relação a sua composição, a mielina é caracterizada pela alta porcentagem lipídica, correspondendo a cerca de 85% de seu peso seco. Entre as classes lipídicas mais abundantes estão o colesterol, fosfolípidios (exemplo: plasmalogênio e esfingomielina) e glicolípido (exemplo: galactosilceramida). Proteínas também fazem parte da estrutura, algumas únicas da mielina do SNP, como a proteína zero de mielina (do inglês “myelin protein zero”- MPZ ou P0), proteína periférica 22 (do inglês “peripheral myelin protein”-PMP22) e a proteína mielínica P2 (do inglês “peripheral protein 2”- P2). Além disso, a proteína básica de mielina (do inglês “myelin basic protein”- MBP), presente em ambos SNC e SNP (Boggs & Moscarello, 1978; Lee, 2001; Poitelon et al., 2020; Rasband & Macklin, 2012).

A mielina contém outras proteínas, como a glicoproteína associada à mielina (do inglês “myelin-associated glycoprotein”-MAG) e a glicoproteína de membrana (“Schwann cell membrane glycoprotein”-SAG), contudo, as proteínas mencionadas acima são observadas em maior abundância na mielina (Rasband & Macklin, 2012). O resumo da organização da bainha de mielina é exibido na figura 3.

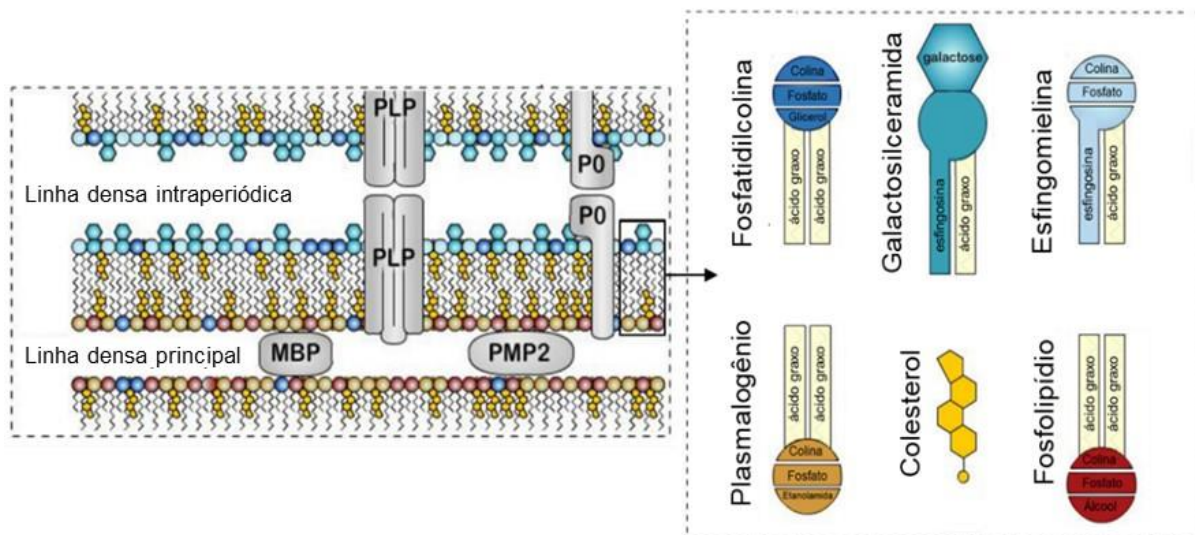


Figura 3. Composição da bainha de mielina do SNP. Assim como observado nas demais membranas celulares, a mielina é constituída por uma bicamada lipídica associada a proteínas. Sua formação ocorre pela aposição da superfície externa e interna da bicamada, gerando a linha intraperiódica e linha densa maior. Entre as moléculas mais abundantes estão os lipídios fosfatidilcolina, galactosilceramida, colesterol, plasmalogeno, esfingomielina, outros fosfolipídios e as proteínas P0, PLP, PMP22 e MBP (Poitelon et al., 2020).

A disposição da mielina estabelece a organização da membrana plasmática do axônio (axolema), formando os domínios do nodo, internodo, paranodo e justaparanodo. Essa disposição facilita a condução do impulso nervoso propagado a partir de mudanças na polaridade da membrana axonal. O nodo é uma pequena região caracterizada pela ausência de mielina e alta densidade de canais iônicos dependentes de voltagem, com predomínio de canais de sódio (Na_v). A célula de Schwann atua diretamente no acúmulo dos canais iônicos no nodo, através da liberação da proteína gliomedina, a qual forma um complexo ancorado no citoesqueleto axonal em conjunto com as proteínas axonais neurofascina, anquirina-G e espectrina β IV. O acúmulo de anquirina-G foi descrito como o responsável por promover o recrutamento dos canais iônicos para a região (Feinberg et al., 2010; Vural et al., 2018).

O internodo representa o domínio com a presença de mielina, consistindo na maior parte das fibras mielínicas. Contudo, apesar da mielina revestir o axônio nessa região, a célula de Schwann não está em contato direto com o axônio, pois existe uma distância de cerca de 15nm entre axônio-glia chamada de espaço periaxonal. Ainda, ao longo do internodo são observadas incisuras de Schmidt-Lanterman, pequenas regiões em que a mielina não se encontra compactada e o citoplasma da célula de Schwann está mais exposto. Acredita-se que as incisuras tenham um papel na distribuição uniforme de nutrientes essenciais no internodo (Rasband & Macklin, 2012).

O paranodo, domínio adjacente ao nodo, é a região em que o axônio está mais próximo da célula de Schwann. Alças formadas a partir da membrana plasmática da Schwann promovem a adesão ao axônio. Por último, o justaparanodo representa o domínio entre o internodo e o paranodo. Canais iônicos de K_v são observados nessa região e, assim como no paranodo, proteínas responsáveis pela adesão celular (Rasband & Peles, 2016; Salzer et al., 2008).

Desse modo, nos axônios mielinizados, o potencial de ação é iniciado no segmento inicial do axônio (do inglês "axon initial segment"-AIS), região proximal do axônio com organização similar ao nodo. A propagação do potencial segue pelos nodos, visto que a mielina impede a passagem do circuito gerado, que salta para o nodo seguinte (Nelson & Jenkins, 2017; Samara et al., 2013). A distância entre nodos equivale a cerca de 1mm ou mais em nervos humanos (Abe et al., 2004). Na figura 4 é exibido o resumo dos compartimentos gerados pela deposição da mielina. O movimento de onda de despolarização entre nodos é muito mais rápido nas fibras mielínicas que em fibras sem mielina, em que o gradiente de íons é dissipado ao longo do comprimento do axônio (Hartline & Colman, 2007).

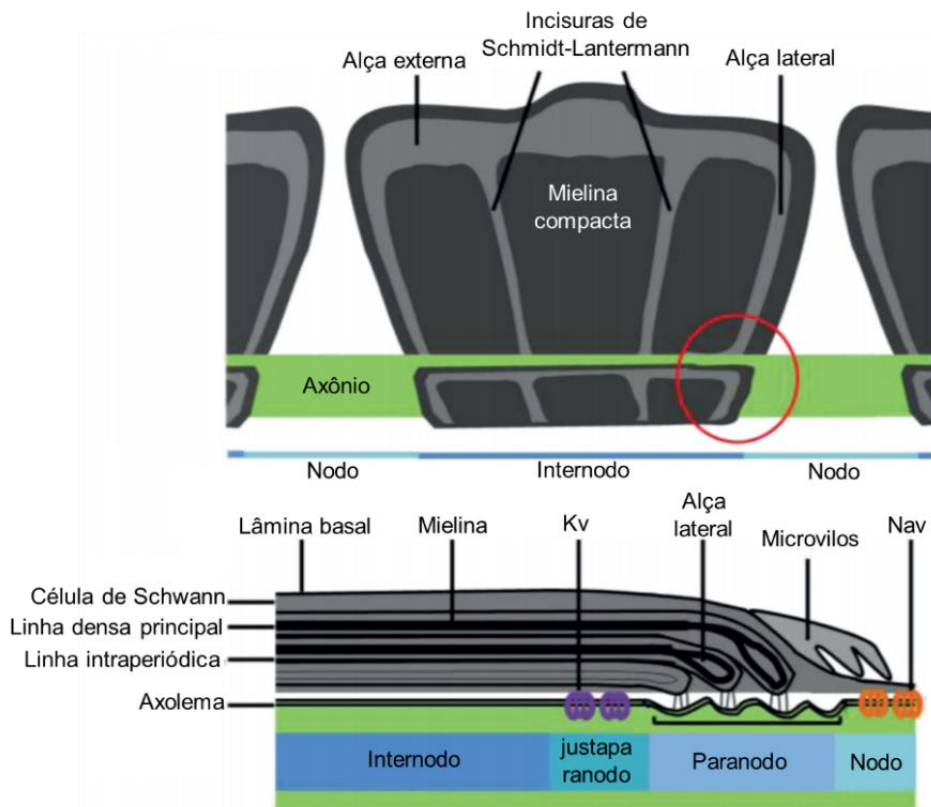


Figura 4. Organização da bainha de mielina em torno do axônio. O axônio é mielinizado pela célula de Schwann, gerando os domínios do nodo, paranodo e justaparanodo. Algumas regiões não apresentam a mielina compacta, como na incisura de Schmidt-Lanterman e as alças laterais/ externas. A deposição espiralada da mielina faz com que dois folhetos internos da membrana se fusionem, gerando a linha densa, região mais escura observada no microscópio. Os folhetos externos também se aproximam, criando a linha intraperiódica. No axônio mielinizado, canais iônicos são restritos à região do nodo e paranodo. Adaptado de (Rasband & Macklin, 2012).

A fibra não mielinizada, também conhecida como amielínica, está em contato com a célula de Schwann, entretanto, não há formação da bainha de mielina. Nesse caso uma única célula de Schwann engloba até 15 axônios, formando o feixe de Remak. Axônios aferentes de neurônios sensoriais nociceptivos estão associados a células de Schwann amielínicas, formando fibras C. Enquanto os axônios com maior calibre se associam de maneira 1:1 a células de Schwann mielínica. Os nervos podem apresentar somente fibras nervosas sensoriais (nervos ópticos), fibras motoras (nervos oculomotores) ou, ainda, serem compostos por ambos os tipos de fibras (nervo isquiático) (Feldman et al., 2017).

Para se chegar às estruturas tubulares dos nervos, existem três camadas de tecido conjuntivo que estabelecem essa organização, chamadas de endoneuro,

perineuro e epineuro. O endoneuro é o compartimento interno em que as fibras nervosas estão imersas, é composto por fibroblastos, fibras colágenas e reticulares e matriz extracelular. Essa região apresenta microvasos que fazem o suprimento de oxigênio e nutrientes às fibras. O endoneuro, em conjunto com as células epiteliais que revestem os microvasos, atuam como barreira seletiva semi-permeável a elementos vindos do sangue, a barreira sangue-nervo (BNB) (Neal et al., 2009). Essas células endoteliais são unidas por junções apertadas (do inglês “tight junctions”), formada por uma rede de proteínas transmembranares, tal como claudinas 1/3 e ocludinas 1/2 (Richner et al., 2019). Além disso, os capilares apresentam pericitos, células fusiformes de origem mesenquimal que formam uma camada entorno das células endoteliais (Shimizu et al., 2011).

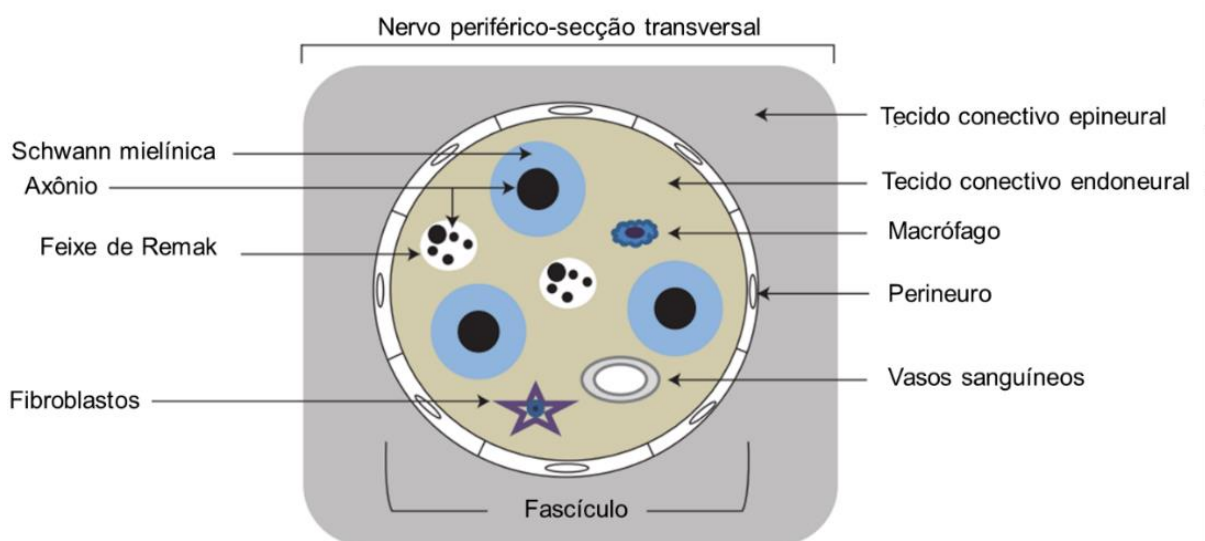


Figura 5. Principais componentes da estrutura dos fascículos. Camadas de tecido conjuntivo segregam os axônios mielinizados e as fibras de Remak, organizando-os em fascículos. Fibroblastos, macrófagos e vasos sanguíneos estão presentes no compartimento interno do nervo. Na imagem o perineuro é mostrado de forma simplificada como uma única camada de células. Adaptado de (Kristján R. Jessen et al., 2015).

O perineuro é a camada que delimita o conjunto de fibras imersas no endoneuro, formando a estrutura conhecida como fascículo. Sete a oito camadas de fibroblastos perineurais o compõem, conferindo a esta região propriedades elásticas e resistência a patógenos e certos danos mecânico (figura 5) (Kucenas, 2015; Liu et al., 2018). Junções apertadas também estão presentes entre os fibroblastos do perineuro. Em humanos, o diâmetro entre os diversos fascículos presentes em cada nervo variam de 0,1 a 1 mm (Kristján R. Jessen et al., 2015). Todos os fascículos são delimitados pelo

epineuro, a camada de tecido conjuntivo mais externa do nervo, composto principalmente por matriz colágena do tipo I e III e fibroblastos. O epineuro apresenta vasos sanguíneos extrínsecos e tecido adiposo. As células endoteliais que formam os vasos sanguíneos presentes no tecido epineural não são conectadas por junções apertadas, diferente do observado nos vasos endoneurais (figura 6) (Chen et al., 2019; Stewart, 2003).

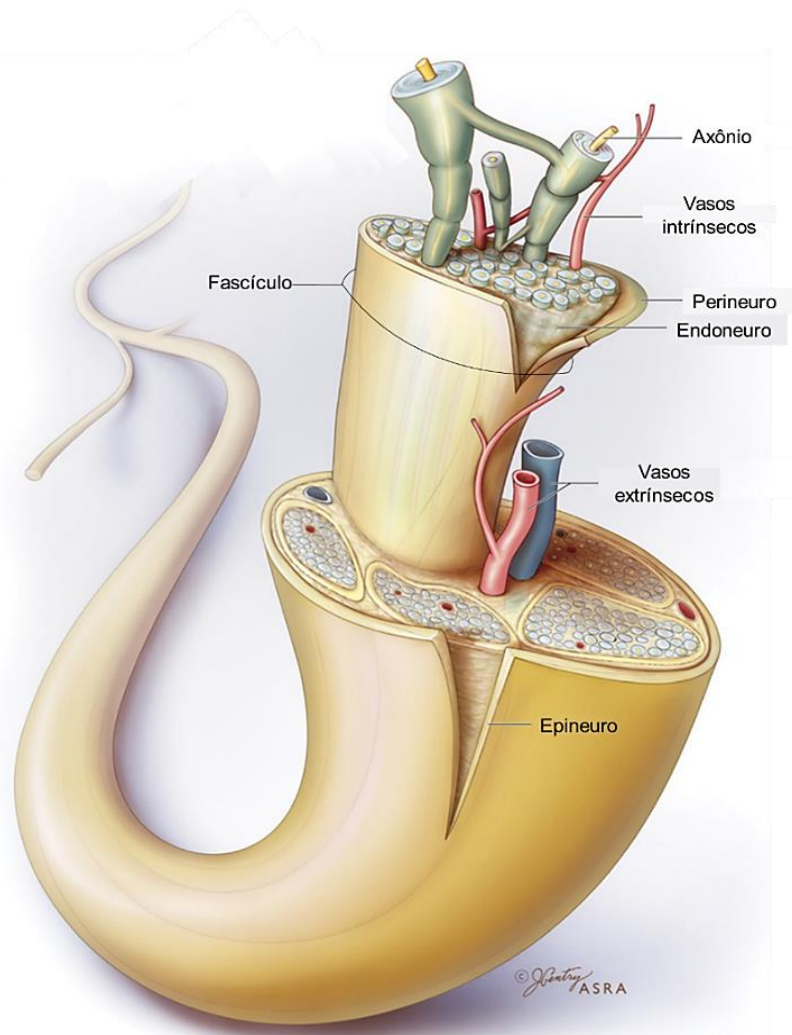


Figura 6. Visão geral da estrutura do nervo periférico. Uma parte dos axônios individuais é envoltos pela bainha de mielina formada pela célula de Schwann enquanto grupos de axônios são englobados por células de Schwann gerando as fibras de Remak. Axônios mielinizados ou não, são agrupados pelo tecido conjuntivo no endoneuro e delimitados pelo perineuro, gerando o fascículo. Todos os fascículos são envoltos pelo epineuro, camada mais externa que circunda o nervo. Vasos sanguíneos estão presentes na região endoneural e epineural. Retirado de Neal et al., 2009.

1.3 Interdependência axônio-glia

1.3.1 Interação axônio e glia no processo de diferenciação das células de Schwann

A interação entre o axônio e a célula de Schwann tem início durante o período do desenvolvimento do sistema nervoso periférico, onde estabelecem uma relação de interdependência. A célula de Schwann madura é o resultado do processo de diferenciação que envolve dois estágios intermediários, as células de Schwann precursoras (SCp) e imaturas (imSC) (Fledrich et al., 2019; Kristjan R. Jessen & Mirsky, 2019a). Brevemente, as células da crista neural migram para o mesenquima, onde se diferenciam em células precursoras e entram em contato com os axônios de neurônios que se estenderam a essa região. Jessen e Mirsky (2019) consideram as células precursoras como células gliais iniciais, uma vez que essas células apresentam pelo menos duas características essenciais à glia, o contato com o axônio e a expressão de genes pró-mielina.

À medida que as células precursoras progridem à imaturas, também dão origem a fibroblastos que permanecem dentro dos nervos. As células de Schwann imaturas passam pelo “radial sorting”, processo em que a lâmina basal da célula de Schwann se remodela para isolar o axônio. Primeiro, diversos axônios são envoltos pela lâmina basal da célula de Schwann (estágio 1), que em seguida emite processos celulares que reconhecem axônios de maior calibre (estágio 2 e 3). No final desse processo, axônios maiores segregados estabelecem a relação 1:1 com células de Schwann promielinizantes (estágio 4 e 5). Enquanto axônios de menor calibre formam feixes de Remak (figura 7) (Fledrich et al., 2019).

Algumas moléculas axonais foram descritas por atuar na sobrevivência e orientação das células de Schwann em desenvolvimento. Entre elas, a mais estudada é a neuregulina (NRG), uma família de proteínas envolvidas na sinalização de estimulação da proliferação celular. A neuregulina 1 do tipo III (NRG1-III) é a principal isoforma presente na superfície axonal. Por possuir dois domínios transmembranares, é necessária a clivagem proteolítica para apresentar efetivamente o domínio do fator de crescimento epidérmico (do inglês “epidermal growth factor”- EGF) ativo na superfície axonal, permitindo que o NRG1-III se ligue aos receptores de tirosina quinase ErbB2 ou ErbB3 presentes nas células gliais (Birchmeier & Nave, 2008).

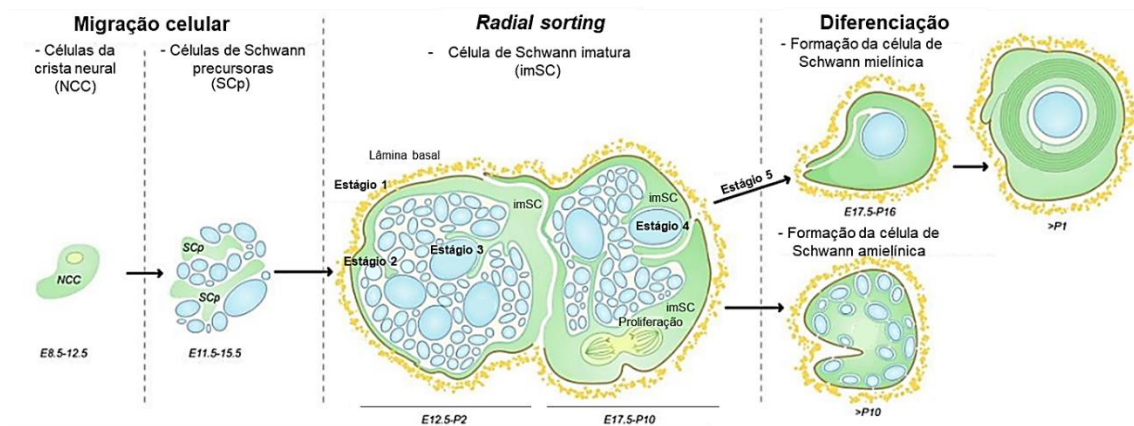


Figura 7. Interação axônio-glia durante o desenvolvimento do SNP. As células precursoras de Schwann originárias da crista neural passam pelo processo morfogênético de *radial sorting* para a geração de células de Schwann maduras. O período do desenvolvimento em que cada etapa ocorre em camundongo é indicado na figura, em que “E” é o período embrionário e “P” pós-natal. Retirado de (Feltri et al., 2016).

A proteólise para ativar a NRG1-III é realizada pela proteína associada à membrana β -secretase 1 (BACE1), enquanto sua inibição é feita por outra protease, α -secretase (TACE), também conhecida como ADAM17 (La Marca et al., 2011; Willem et al., 2006). Sabe-se que a NRG1-III é essencial para a sobrevivência das células precursoras e sua depleção em camundongos causa a diminuição drástica dessas células em nervos embrionários e, conseqüentemente, impacta negativamente o aparecimento de células de Schwann imaturas (Birchmeier & Nave, 2008). Além disso, foi demonstrado que a quantidade de NRG1-III na superfície axonal é importante para o reconhecimento da célula de Schwann imatura durante o “radial sorting” (Nave & Salzer, 2006).

A sinalização de notch também está presente entre axônio e célula de Schwann. Axônios apresentam os ligantes de notch Jagged 1/2 e Delta 1/3 (DLL 1 e 3), e foi demonstrado em experimentos *in vivo* que a sinalização de notch ativa o fator transcricional RBPJ em precursoras de células de Schwann via receptor de notch, o que promove a diferenciação à célula de Schwann imatura (Woodhoo et al., 2009).

Sabe-se que a dependência de fatores axonais para a sobrevivência das células de Schwann vai diminuindo ao passo que as células se tornam mais diferenciadas. Uma prova disso é o fato de que a partir do estágio das células imaturas, é possível mantê-las em culturas sem o contato axonal, após sua dissociação do nervo, diferentemente do observado em células precursoras, que requerem, por exemplo, de suplementação com NRG1-III para a sobrevivência (Grinspan et al., 1996).

Adicionalmente, muitos fatores intrínsecos regulam o desenvolvimento das células de Schwann, como o fator de transcrição SOX10 e AP2 α , além das proteínas expressas em sua matriz extracelular, como laminina e colágeno (Fledrich et al., 2019).

1.3.2 Plasticidade da célula de Schwann após a lesão do nervo

Uma característica notável da célula de Schwann é a sua enorme plasticidade, já que grande parte dessa sequência de eventos de desenvolvimento descritas no item 1.3.1 é reversível. Em casos de lesão nervosa, as células mielínicas e amielínicas se transdiferenciam a um fenótipo semelhante ao das células imaturas, um mecanismo que faz parte do processo de regeneração do SNP (Kristjan R. Jessen & Mirsky, 2019b).

O processo de degeneração consiste em duas etapas, primeiro ocorre a desmontagem dos axônios e segundo a depuração dos detritos por células de Schwann e macrófagos. Desse modo, após a lesão, o axônio é degenerado num processo ativo e ordenado conhecido como degeneração Walleriana (Llobet Rosell & Neukomm, 2019). Inicialmente, há o aumento de íons cálcio (Ca^{2+}) na região proximal e distal ao local da lesão e, posteriormente, ocorre o esgotamento de NAD^+ e de ATP. As mitocôndrias perdem a capacidade de manter o potencial de membrana, adquirem o aspecto inchado e liberam suas reservas de Ca^{2+} , caracterizando a segunda onda deste íon. Nessa etapa a geração de espécies reativas de oxigênio (do inglês “reactive oxygen species”-ROS) é elevada e o axônio começa a se fragmentar (Llobet Rosell & Neukomm, 2019).

Portanto, a célula de Schwann circundante perde o contato com o axônio e muda radicalmente seu fenótipo. Alguns trabalhos descrevem essa reprogramação celular adaptativa como dediferenciação, mas para Jessen e Mirsky (2019) o termo mais apropriado é a transdiferenciação, pois a célula de Schwann re-expressa os marcadores da célula imatura e, além disso, também exibe características distintas do seu fenótipo original (Arthur-Farraj et al., 2012).

Durante a reprogramação, a célula de Schwann mielínica cessa a expressão de genes associados à mielinização, como o Krox20, e começa a apresentar genes relacionados à células de Schwann amielínicas (NCAM, p75NTR, GFAP e L1) e

alguns marcadores encontrados em células imaturas (Notch, ERK1/2, TGFb e gpr126) (Kristjan R. Jessen & Mirsky, 2019a).

Adicionalmente, os dois tipos de células de Schwann encontradas no nervo adulto podem ser reprogramadas após a lesão. Além disso, genes específicos da célula de Schwann de reparo são observados, como Olig1 e Shh, ambos regulados pelo fator de transcrição cJun (Arthur-Farraj et al., 2012). Conforme mostrado na figura 8, após a lesão a célula de Schwann passa por grande remodelamento celular. A célula de Schwann de reparo é cerca de três vezes maior que células amielínicas e duas vezes maior que as células mielínicas (Kristjan R. Jessen & Mirsky, 2019b).

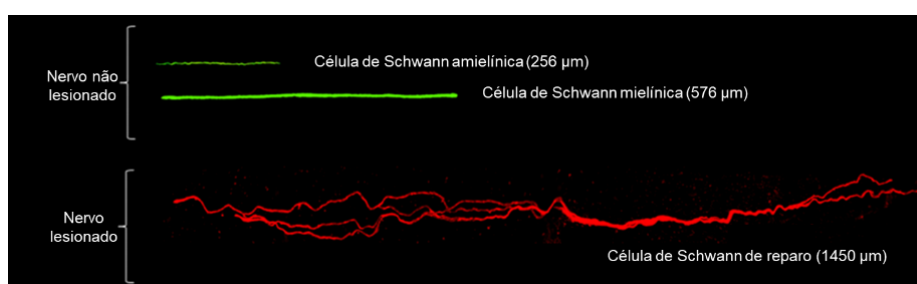


Figura 8. Diferenças no comprimento dos tipos de célula de Schwann vistas no nervo. (Kristjan R. Jessen & Mirsky, 2019b)

A célula de schwann de reparo fornece fatores tróficos necessários para a sobrevivência dos axônios durante a elongação, alguns deles são o GDNF (do inglês “glial cell-derived neurotrophic fator”), BDNF (do inglês “brain-derived neurtrophic factor”), NT3 (do inglês “neurotrophin-3”) e NGF (do inglês “nerve growth factor”) (Verderio et al., 2006). FGF-2 (do inglês “fibroblast growth factor”) também é produzido por células de Schwann de reparo, bem como por células endoteliais vasculares (Grothe et al., 2001). Muitas citocinas são liberadas pelas células de reparo, algumas foram descritas por atraírem macrófagos ao sítio lesionado. As citocinas interleucina 6 (IL-6) e LIF (do inglês “leukemia inhibitory factor”) são liberadas pela célula de Schwann de reparo e atraem macrófagos para o nervo, gerando mais citocinas inflamatórias secretadas agora pelos macrófagos. Juntos, células de reparo e macrófagos retiram os debris de mielina do nervo lesionado. Conforme mostrado na figura 9, as células de Schwann de reparo proliferam e passam por um alongamento impressionante, gerando as bandas de Büngner, unidades de regeneração necessárias para guiar os axônios de volta aos seus sítios alvo, com a ajuda de fibroblastos (Boerboom et al., 2017; K. R. Jessen & Mirsky, 2016; Kristján R. Jessen et al., 2015).

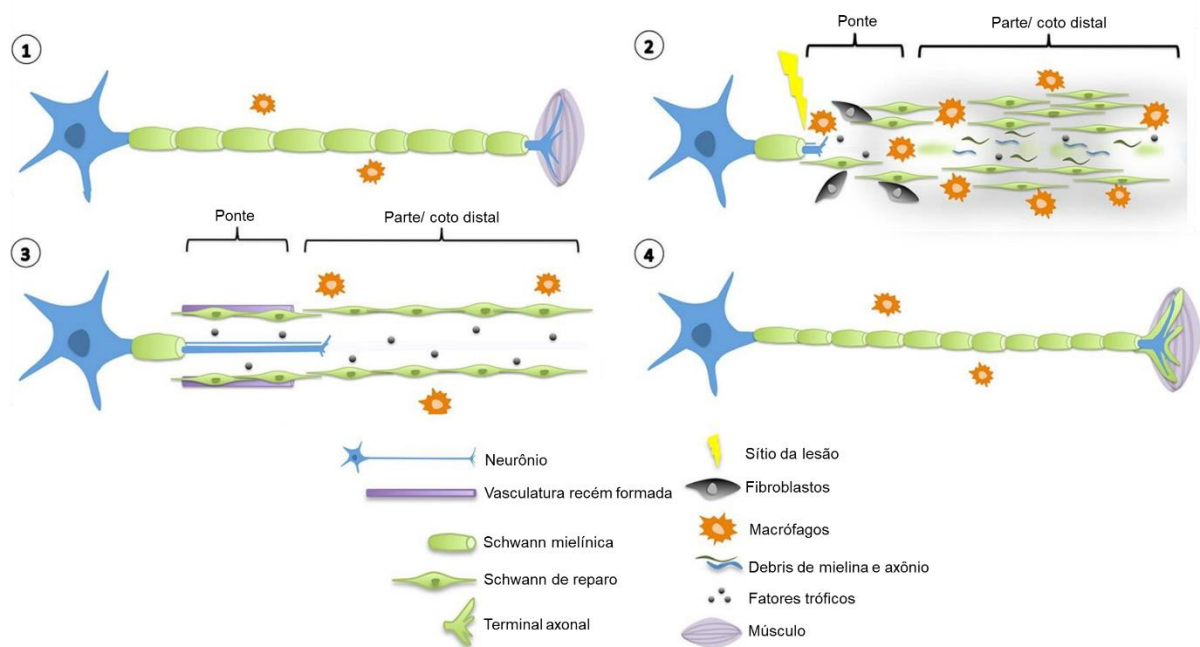


Figura 9. Resumo da importância das células de Schwann após a lesão. (1) Ilustração do neurônio com seu axônio mielinizado e macrófagos residentes. (2) Início da degeneração após a lesão, as células Schwann mudam sua morfologia transformando-se em células de reparo, favorecendo a sobrevivência neuronal pela liberação de fatores de crescimento. Citocinas pró-inflamatórias atraem mais macrófagos para o local, favorecendo a fagocitose de detritos celulares. Fibroblastos em conjunto com células de Schwann formam pontes entre os dois cotos do nervo. (3) A vasculatura recém-formada guia o axônio em crescimento, enquanto as bandas de Büngner formadas por células de Schwann fornecem suporte físico e trófico a parte distal do axônio. (4) Com o fim da regeneração, a Schwann se diferencia novamente e remieliniza o axônio. (Boerboom et al., 2017).

1.3.3 Acoplamento energético axônio-glia

1.3.3.1 Visão geral do metabolismo de carbono nas células eucarióticas

Antes de ser discutido o acoplamento metabólico entre axônio-glia, uma visão geral do metabolismo energético e seus intermediários será descrita a seguir, para a contextualização do tema.

A glicose é a principal fonte de energia para a maioria dos organismos, sua oxidação pela via glicólise gera energia sob a forma de trifosfato de adenosina (do inglês “adenosine triphosphate”-ATP) e precursores biossintéticos importantes para as células. A glicose presente nos vasos sanguíneos e/ou meio extracelular é internalizada no citoplasma através de difusão facilitada por transportadores de membrana da família GLUT (do inglês “glucose transporter”) (Yu et al., 2016).

Conforme observado na imagem 10, a via glicolítica ocorre no citosol, com a fosforilação da glicose em glicose 6-fosfato. Na sequência, ocorre a conversão da glicose 6-fosfato em frutose 6-fosfato e, após mais uma reação de fosforilação, forma-se a frutose 1,6-bifosfato. A frutose 1,6-bifosfato é dividida em duas moléculas com três carbonos: gliceraldeído 3-fosfato e dihidroxiacetona fosfato. Como duas moléculas de ATP são as doadoras do grupamento fosfato nas reações de fosforilação, essa etapa da glicólise é comumente designada de fase preparatória (Teslaa & Teitell, 2014; Yu et al., 2016).

A dihidroxiacetona fosfato é isomerizada, formando mais uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato, o qual é oxidado e fosforilado por fosfato inorgânico, formando 1,3-bifosfoglicerato. O grupamento fosfato do 1,3-bifosfoglicerato é transferido a adenosina difosfato (do inglês “adenosine diphosphate”-ADP), gerando ATP e 3-fosfoglicerato. Subsequentemente, o 3-fosfoglicerato é isomerizado em 2-fosfoglicerato que, após uma reação de desidratação, forma-se o fosfoenolpiruvato. A via glicolítica termina com a conversão do fosfoenolpiruvato em piruvato, culminando com a síntese de duas moléculas de ATP.

Como duas moléculas de ATP são utilizadas nas primeiras reações da via e quatro são formadas na segunda fase, o rendimento energético por molécula de glicose oxidada via glicólise são de duas moléculas de ATP (Teslaa & Teitell, 2014; Yu et al., 2016). Além da síntese de ATP, a glicólise também fornece intermediários biossintéticos para o crescimento e a proliferação celular. Por exemplo, o intermediário glicolítico 3-fosfoglicerato é um precursor para a biossíntese dos aminoácidos serina, glicina e cisteína, enquanto o piruvato é precursor da alanina, leucina e valina (Locasale, 2013). Ainda, a glicose 6-fosfato, formada na primeira reação da glicólise, pode derivar na via da pentose fosfato (do inglês “pentose phosphate pathway”-PPP).

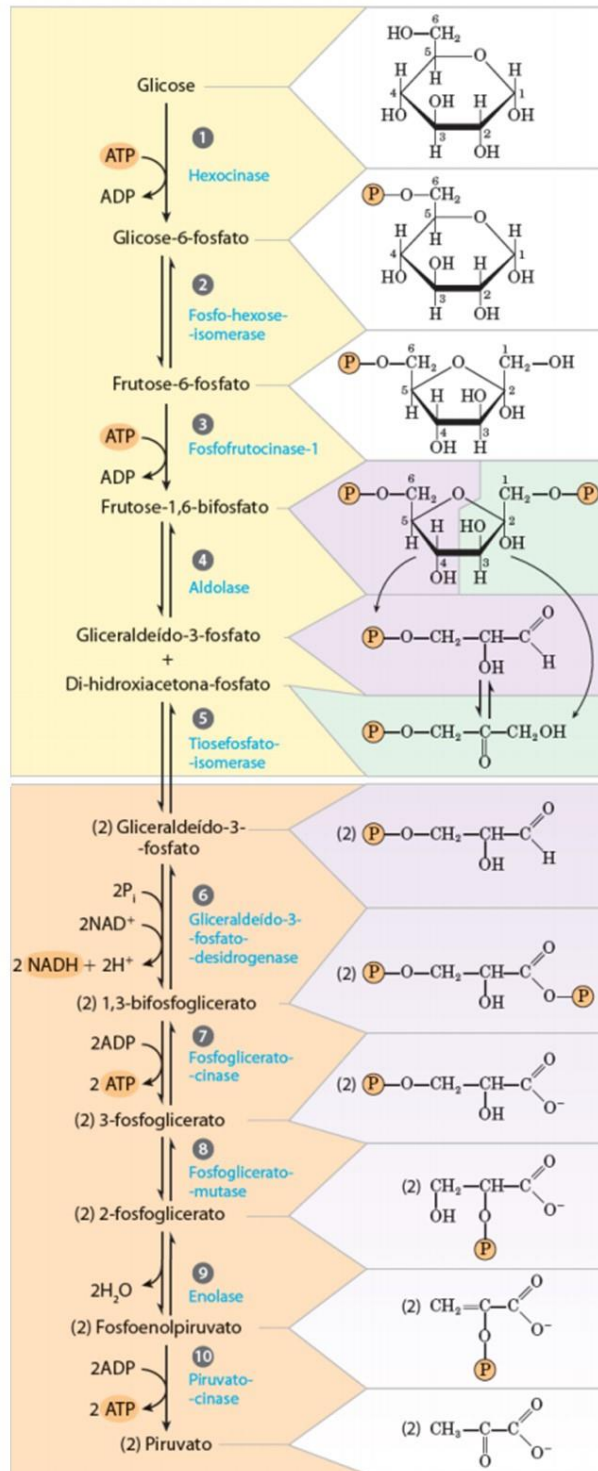


Figura 10. Sequência de eventos da glicólise. Através das enzimas catalisadoras enumeradas na figura (azul), após as dez reações da via, cada molécula de glicose dá origem a duas moléculas de piruvato. A fórmula estrutural das moléculas pode ser observada a direita da figura (Nelson & Cox, 2014).

O piruvato formado na glicólise segue fundamentalmente dois destinos nas células: a fermentação láctica ou o ciclo do ácido tricarboxílico (do inglês “tricarboxylic acid cycle”-TCA). Na mitocôndria, para seguir na via do ciclo do ácido tricarboxílico, o piruvato sofre descarboxilação oxidativa pela enzima piruvato desidrogenase e, em

seguida reage com a coenzima A (CoA), formando a acetilcoenzima A (acetil-CoA). O ciclo tem início com a reação entre o grupo acetila da acetil-CoA com o oxaloacetato em que o citrato é formado (Nelson & Cox, 2015; Teslaa & Teitell, 2014).

A continuação deste ciclo é a sequência de etapas que decompõem citrato em oxaloacetato, voltando à etapa de início. Subsequentemente, o citrato é transformado em seu isômero isocitrato, o qual é oxidado, perdendo um dióxido de carbono (CO_2) formando uma molécula de α -cetoglutarato. Na sequência, ocorre mais uma reação de oxidação, com a retirada de molécula de CO_2 e adição da coenzima A, originando o succinil-CoA. A substituição da coenzima A da molécula de succinil-CoA por um grupamento fosfato forma o succinato, que é também oxidado originando o fumarato. As duas últimas etapas no ciclo do ácido tricarboxílico consistem na redução do fumarato em malato através da adição de uma molécula de água (H_2O) e, em seguida da oxidação do malato em oxaloacetato (Fernie et al., 2004; Nelson & Cox, 2015). A sequência completa do ciclo do ácido tricarboxílico é exibida na figura 11.

Em todas essas reações, os elétrons das moléculas oxidadas são transferidos para as coenzimas dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (do inglês “nicotinamide adenine dinucleotide”- NAD) e o dinucleotídeo de flavina e adenina (do inglês “flavin adenine dinucleotide”- FAD), gerando NADH e FADH_2 , respectivamente. Esses agentes redutores doam seus elétrons para a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, processo conhecido como fosforilação oxidativa. Complexos proteicos localizados nas cristas mitocondriais carregam os elétrons alternando-se entre o estado oxidado e reduzido até o acceptor final oxigênio, reduzindo-o à H_2O (Fernie et al., 2004; Nelson & Cox, 2015).

Assim como certos intermediários da glicólise, no ciclo ácido tricarboxílico existem moléculas precursoras biossintéticas importantes para as células. Nesse contexto, o α -cetoglutarato e o oxaloacetato destacam-se por serem precursores dos aminoácidos glutamina e aspartato, respectivamente. O acetil- CoA é precursor para a síntese de ácidos graxos e colesterol, saindo da mitocôndria em direção ao citosol sob a forma de citrato (Nelson & Cox, 2015).

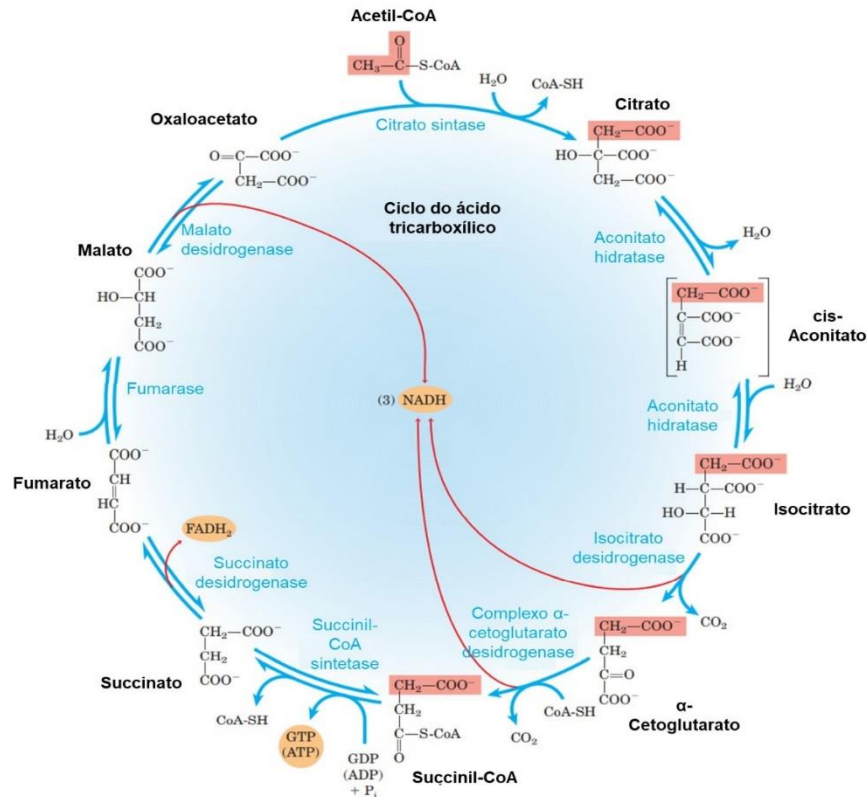


Figura 11. Sequência de reações do ciclo do ácido tricarboxílico. As setas vermelhas indicam as reações onde parte da energia foi conservada sob a forma das coenzimas reduzidas NADH e FADH₂. As enzimas catalisadoras de cada etapa são exibidas em azul. (Nelson & Cox, 2015).

A segunda rota para o piruvato é sua redução a lactato, um processo que ocorre no citosol celular. A reação de redução é catalisada pela enzima lactato desidrogenase, fazendo com que o NAD⁺ seja regenerado à NADH, o que é importante para a continuação da primeira reação da glicólise. Assim, a fermentação láctica permite que a glicólise continue ocorrendo nas células quando há uma redução na reciclagem do pool de NAD⁺ devido à queda na atividade da cadeia respiratória devido baixa tensão de oxigênio, por exemplo (Nelson & Cox, 2015). A produção de lactato pelas células eucarióticas ganhou mais notoriedade com os estudos de Otto Warburg no início do século XX. A oxidação completa da glicose na mitocôndria tem como receptor final de elétrons o oxigênio, assim, na época pensava-se que somente

em condições de hipóxia o piruvato seguiria o caminho da fermentação láctica. Contudo, Warburg notou que células cancerígenas sob condições normais de oxigenação também optavam por essa rota energética, chamando-a de glicólise aeróbica (Locasale & Cantley, 2010).

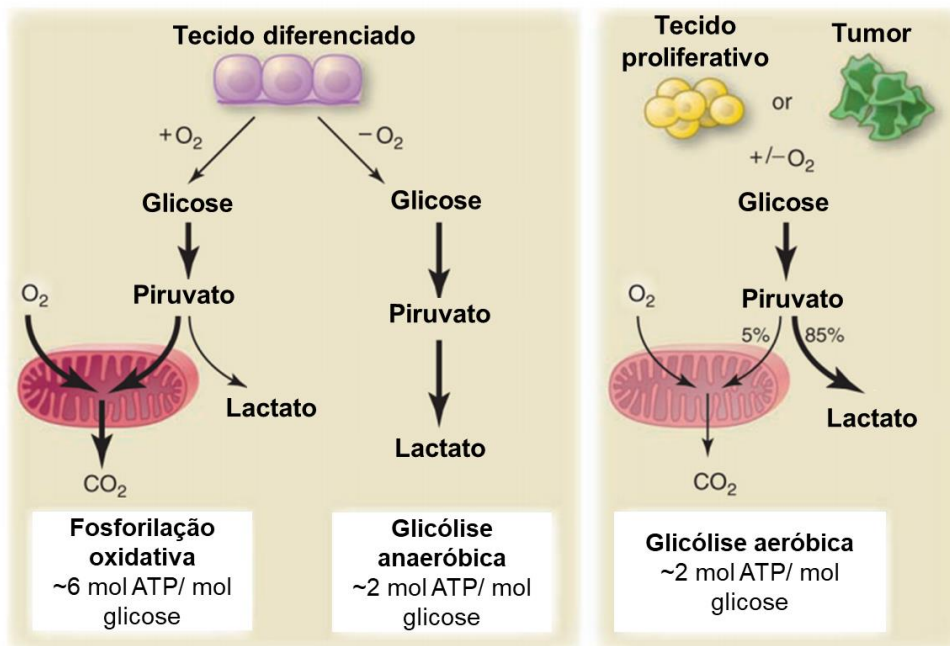


Figura 12. Metabolismo oxidativo de células diferenciadas e cancerígenas. Retirado de (Vander Heiden et al., 2009).

Conforme exibido na figura 12, o rendimento energético da oxidação completa de uma molécula de glicose na via fermentativa é menor que sua oxidação completa até CO₂ e H₂O, no entanto, foi demonstrado que a fermentação é cerca de 100 vezes mais rápida que a oxidação completa da glicose via fosforilação oxidativa (Locasale & Cantley, 2010). Além disso, mais papéis estão sendo atribuídos ao lactato, incluindo na neuroproteção (Proia et al., 2016). Os monocarboxilatos (MCT) são os transportadores que promovem a saída/entrada de lactato nas células. Esses transportadores também medeiam o deslocamento de piruvato, acetato e corpos cetônicos (Halestrap & Price, 1999).

Adicionalmente, a glicose 6-fosfato segue a rota metabólica da via das pentoses fosfato, um importante caminho que gera precursores para a biossíntese de nucleotídeos, aminoácidos aromáticos e moléculas redutoras utilizadas no anabolismo e no equilíbrio redox celular. A via das pentoses é dividida em fase oxidativa e não oxidativa. No citosol, a oxidação da glicose 6-fosfato pela enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) dá início a via, formando o 6-fosfoglicano-δ-lactona. O

análogo fosforilado de NAD⁺, o NADP recebe o hidrogênio, gerando adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH). Em seguida, a lactona da molécula 6-fosfoglucono-δ-lactona é hidrolisada, originando o 6-fosfogliconato, o qual sofre oxidação e descarboxilação, gerando uma molécula de ribulose 5-fosfato e outro NADPH (Stincone et al., 2015).

A fase não oxidativa da via das pentoses recicla pentoses fosfato em glicose 6-fosfato. Primeiro, a ribulose 5-fosfato é epimerizada em xilulose 5-fosfato. A enzima transcetolase transfere C1 e C2 da xilulose 5-fosfato para a ribose 5-fosfato, formando a sedoheptulose 7-fosfato, restando o gliceraldeído 3-fosfato. Subseqüentemente, a enzima transaldolase catalisa a remoção de três carbonos da sedoheptulose 7-fosfato e é condensado com uma molécula de gliceraldeído 3-fosfato, formando a frutose 6-fosfato e a eritrose 4-fosfato. Adicionalmente, a xilulose 5-fosfato e a eritrose 4-fosfato podem ser convertidas em frutose 6-fosfato e gliceraldeído 3-fosfato, pela ação novamente da transcetolase (Stincone et al., 2015).

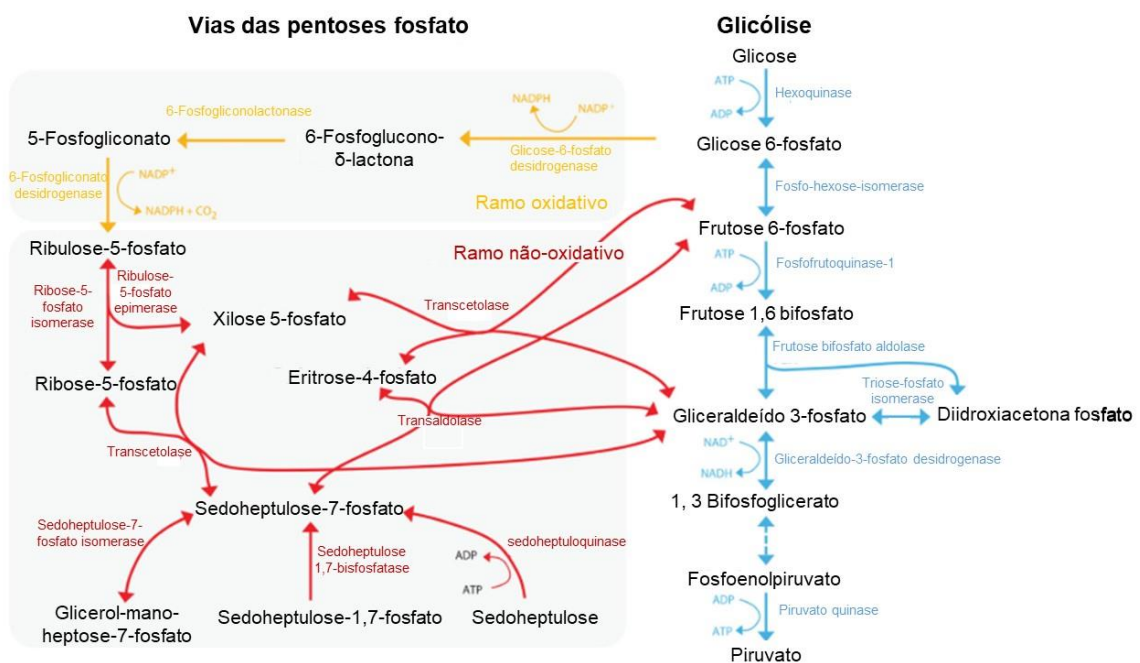


Figura 13. Via das pentoses fosfato e suas conexões com a glicólise (Stincone et al., 2015).

Assim, a fase não oxidativa da via das pentoses fosfato compartilha metabólitos com a glicólise, como por exemplo a frutose 6-fosfato e o gliceraldeído 3-fosfato, reações catalisadas pelas enzimas transcetolase e transaldolase (figura 13). A molécula de ribose 5-fosfato sintetizada na via das pentoses é utilizada para formação dos nucleotídeos celulares, enquanto o NADPH impulsiona o metabolismo anabólico

de síntese de lipídios. Além disso, o NADPH é fundamental para a redução da glutationa (GSH), um tripeptídeo que atua prevenindo a formação de radicais livres. Para a biossíntese do aminoácido aromático histidina, é necessário o seu precursor eritrose 4-fosfato, outro componente formado na via das pentoses (Peiró et al., 2016; Stincone et al., 2015).

Desse modo, glicólise, ciclo do ácido tricarboxílico, fermentação e via das pentoses são vias centrais para a atividade anabólica e catabolismo celular. Algumas vias garantem o suprimento de intermediários metabólicos, a gliconeogênese, por exemplo, é o processo de síntese de glicose a partir de precursores não carboidratos de três e quatro átomos de carbonos, como aminoácidos glicogênicos. Reações anapleróticas asseguram o suprimento de intermediários do ácido tricarboxílico. O resumo do metabolismo da glicose e suas rotas afluentes que levam à síntese de lipídios e aminoácidos são mostrados abaixo (figura 14).

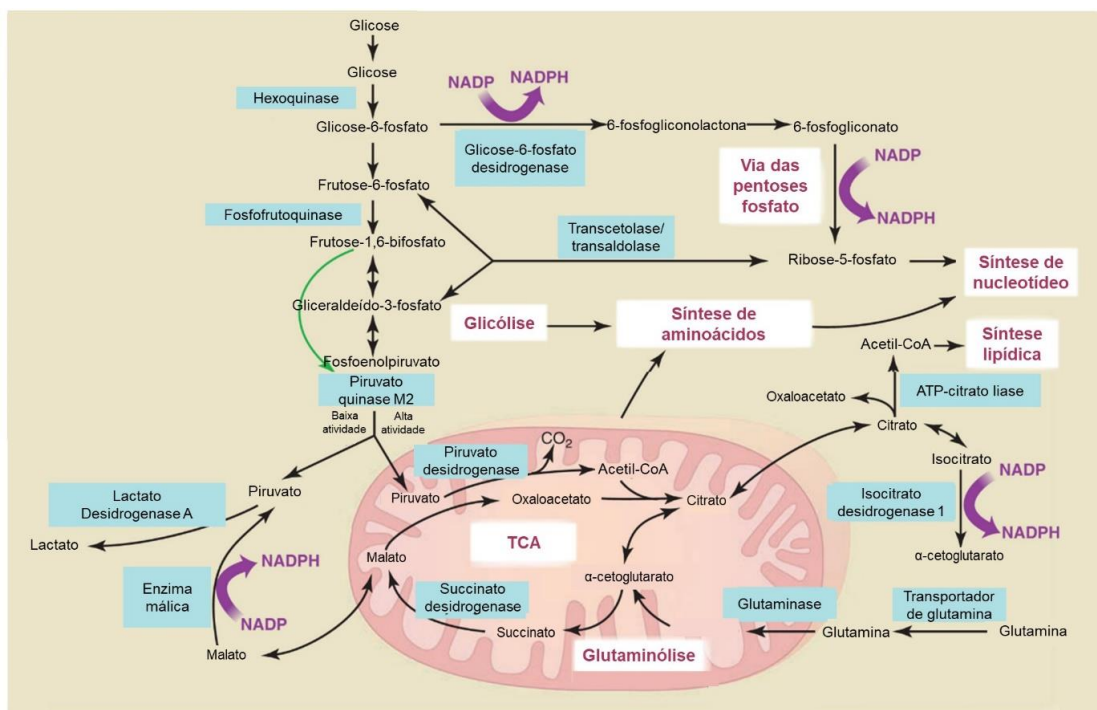


Figura 14. Resumo das principais vias do metabolismo de carbono nas células. No citosol, a oxidação da glicose pela glicólise gera piruvato, que segue para a mitocôndria para o ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e fosforilação oxidativa ou, ainda no citosol, o piruvato é reduzido a lactato. A glicose pode ser desviada para a via das pentoses fosfato, importante via geradora de poder redutor e pentoses usadas na síntese de nucleotídeos. Glicólise, TCA e via das pentoses sintetizam moléculas precursoras de aminoácidos celulares, na qual a síntese ocorre a partir da adição de grupamentos amina via glutamina ou outro aminoácido doador. Lipídios são sintetizados a partir do grupo acetila da acetil-coA mediante seu transporte para o citosol feito pelo citrato e poder redutor na forma de NADPH formado em certas reações das vias. Aminoácidos e lipídios também são oxidados na mitocôndria (Vander Heiden et al., 2009).

1.3.3.2 Metabolismo energético axônio-glia

As investigações do acoplamento energético entre glia e axônio ganharam força no sistema nervoso central com a hipótese proposta por Magistretti e Pellerin, em que a glicose captada dos capilares sanguíneos por astrócitos é armazenada sob a forma de glicogênio nessas células. Com o aumento da demanda metabólica, o glicogênio é oxidado preferencialmente em lactato e, em seguida, absorvido por neurônios vizinhos via transportador de monocarboxilato (MCT) (Magistretti et al., 1993; Pellerin et al., 1997).

De fato, os axônios mielinizados são expostos à substratos extracelulares apenas nos nodos, portanto, o transporte de metabólitos energéticos como o lactato, glicose e piruvato vindos da glia atendem a alta demanda energética axonal. Estima-se que $4-8 \times 10^8$ moléculas de ATP são utilizadas na recuperação do gradiente eletroquímico após a geração de um potencial de ação no axônio (Hallermann et al., 2012). Em adição aos mecanismos abordados no item anterior, após a lesão, o suporte energético da glia parece ser fundamental para a sobrevivência axonal.

Atualmente sabe-se que astrócitos e oligodendrócitos liberam lactato para os neurônios do SNC. O MCT1 é o principal transportador de lactato presente na glia do SNC enquanto MCT2 é observado em neurônios. A depleção seletiva de MCT1 em astrócitos ou oligodendrócitos leva à lesão neural em modelos animais. Foi demonstrado por Saab e col. (2016) que receptores ionotrópicos ativados por glutamato (do inglês "N-methyl-D-aspartate receptor"- NMDA) presentes na membrana de oligodendrócitos aumentam a expressão de GLUT1 em resposta ao aumento de atividade elétrica axonal e liberação de glutamato. Assim, mais glicose é

internalizada e oxidada nos oligodendrócitos para o suporte axonal. O resumo do acoplamento metabólico axônio-glia no sistema nervoso periférico é exibido na figura 15.

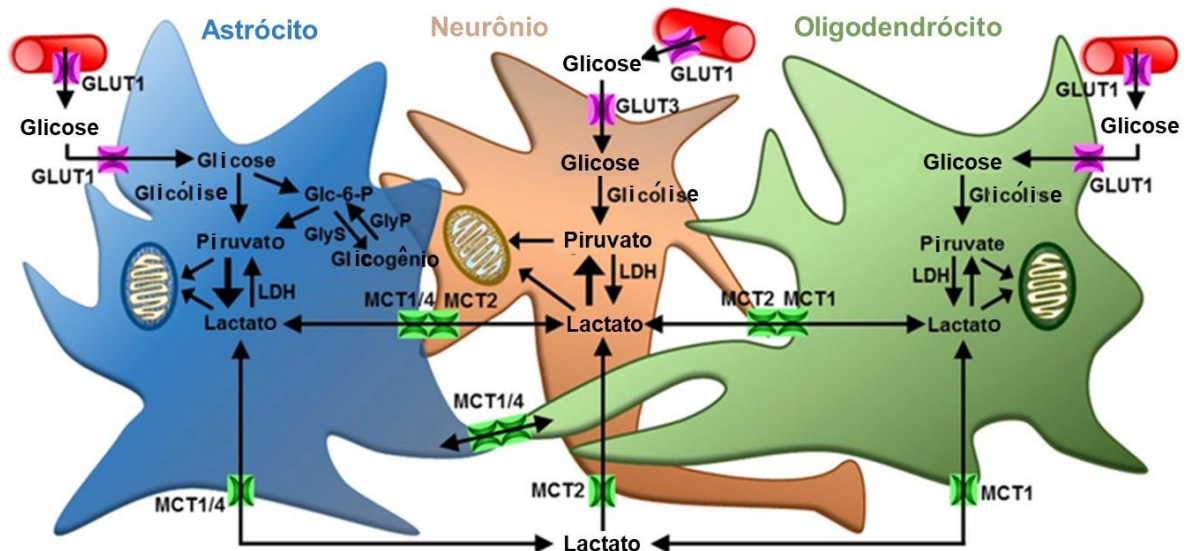


Figura 15. Acoplamento energético entre glia e neurônio no sistema nervoso central. Astrócitos e oligodendrócitos fornecem lactato aos neurônios através de MCT's. Além disso, a reserva de glicose sob a forma de glicogênio nos astrócitos também é direcionada à oxidação quando necessário (Jha & Morrison, 2018).

Conforme já mencionado, no SNP os axônios dos neurônios atingem longas distâncias do corpo celular, tornando o suporte axonal crítico. Os transportadores de glicose (GLUT) estão presentes no SNP nos capilares sanguíneos endoneuriais/perineurais, células de Schwann e axônios. A chegada de glicose no endoneuro ocorre pelos capilares endoneurais via GLUT1 e/ou perineuro via GLUT3 (Magnani et al., 1996; Choeiri et al., 2002).

Foi observado que as células de Schwann apresentam principalmente GLUT1 e sua distribuição em células mielinizantes ocorre nos locais sem mielina compactada, isto é, no paranodo e incisuras de Schmidt-Lanterman. Além disso, GLUT3 também é expresso nas células de Schwann e no axônio. Desse modo, uma vez no endoneuro, a glicose pode ser internalizada diretamente pelo axônio via GLUT3 e/ou seguir para a célula de Schwann (Magnani et al., 1996).

Semelhante ao observado no SNC, Evans e col. (2013) determinaram que a glicose é estocada sob a forma de glicogênio em células de Schwann mielínicas no nervo isquiático de camundongos, e que em condições hipoglicêmicas os granulos de glicogênio diminuem e a condução da fibra é mantida. Ainda, foi detectado lactato no espaço extracelular do nervo e sua diminuição também foi tempo-dependente do

estado hipoglicêmico, sugerindo a mobilização do glicogênio a lactato das células de Schwann para a fibra nervosa.

Outros estudos destacaram a importância do lactato glial em modelos animais em que os MCTs são depletados. Entre os transportadores de monocarboxilatos, o MCT1 é o que possui maior afinidade ao lactato, e curiosamente é expresso predominantemente no nervo, observado no perineuro, axônio e nas células de Schwann. Além deste, MCT4 também é expresso, mas até o momento foi observado somente em células de Schwann. A localização dos MCTs nas células de Schwann ocorre principalmente nas regiões sem mielina compactada, assim como observado com GLUT1, sugerindo a troca de metabólitos com o axônio (Domenech-Estevéz et al., 2015; Sonveaux et al., 2008). O resumo da localização dos transportadores GLUT e MCT é mostrado abaixo (figura 16).

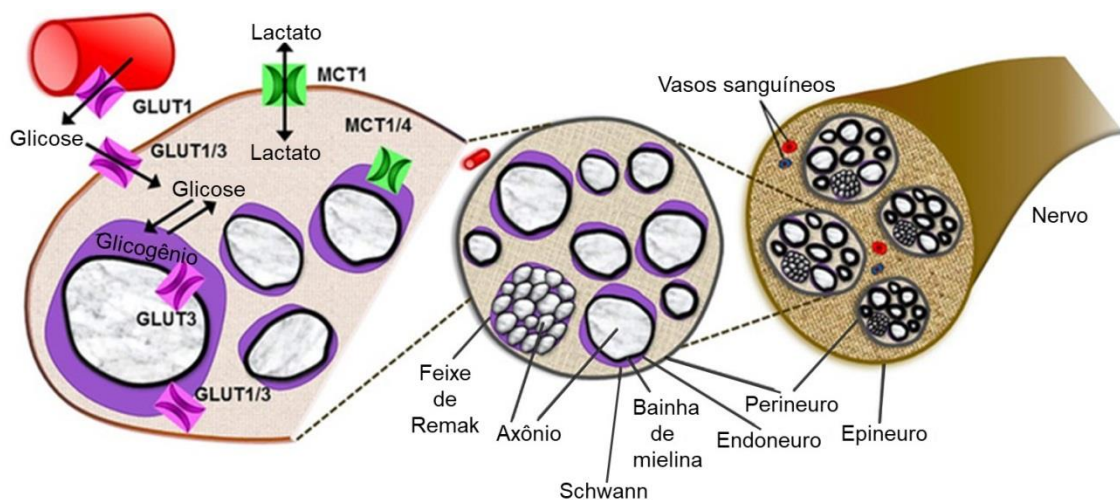


Figura 16. Distribuição dos transportadores de glicose (GLUT) e lactato (MCT) no sistema nervoso periférico. Glut1 e 3 são expressos na célula de Schwann e no perineuro enquanto neurônios expressam Glut3. O principal transportador de monocarboxilato presente no nervo é o MCT1, expresso no perineuro, axônio e Schwann. Além disso, células de Schwann também expressam MCT4 (Jha & Morrison, 2018).

Recentemente a adaptação metabólica das células de Schwann em resposta ao dano axonal foi demonstrada de modo detalhado por Babetto e col. (2020). Pouco tempo após a lesão ocorre a ativação do complexo C1 de mTOR (do inglês “target of rapamycin”) nas células de Schwann, o que promove o aumento da glicólise através ativação do fator de transcrição HIF1 α (do inglês “hypoxia-inducible factor”) e do gene C-MYC. Com o aumento da via glicolítica nessas células, piruvato e lactato são liberados para o axônio e impedem a degeneração axonal precoce (figura 17). Ainda, em co-culturas de gânglio da raiz dorsal e células de Schwann, a inibição

farmacológica de MCT1/4 acelera a degeneração após a transecção dos neuritos nesse modelo.

Além disso, foi demonstrado em modelos animais que a disfunção no metabolismo da célula de Schwann pode levar à degeneração axonal. Os grupos de pesquisa se concentraram nos efeitos da depleção da serina/treonina quinase (LKB1), principal alvo da proteína AMPK que regula o metabolismo energético celular, e na disfunção mitocondrial pela depleção de TFAM (do inglês “transcription factor A, mitochondrial”), proteína necessária para a transcrição e organização do DNA mitocondrial (mtDNA). Curiosamente, animais mutantes condicionais nas células de Schwann para LKB1 ou TFAM apresentam perda de fibras amielínicas e posterior desmielinização das fibras mielínicas (Beirowski et al., 2014; Viader et al., 2013).

Nos animais mutantes em TFAM, o dano mitocondrial nas células de Schwann levou ao aumento da β -oxidação de lipídios da mielina e liberação destes ao axônio. Foi demonstrado que acilcarnitinas de cadeia longa resultantes da oxidação da mielina danificam a membrana plasmática axonal levando à degeneração axonal (Viader et al., 2013).

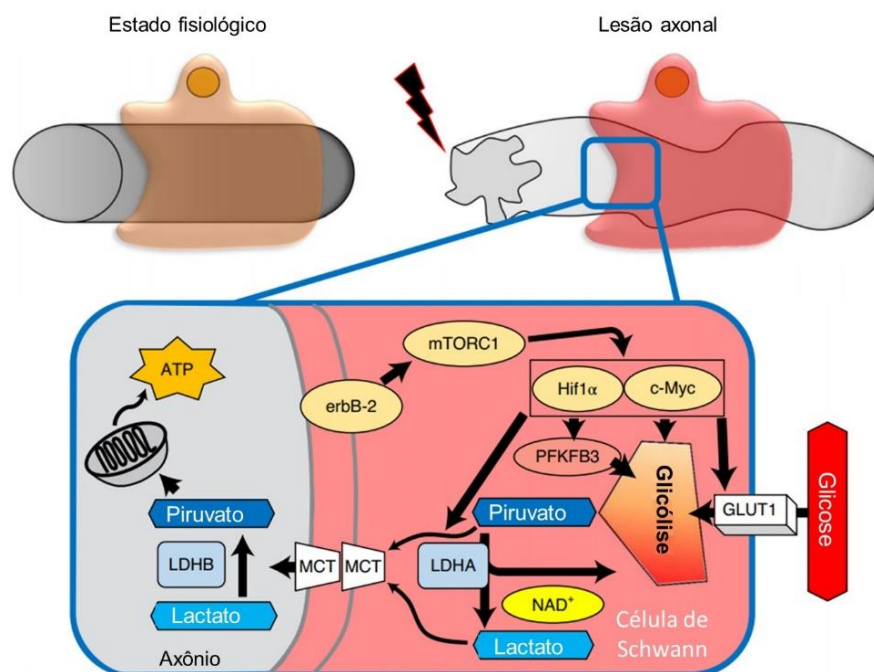


Figura 17. Adaptações metabólicas das células de Schwann após a lesão axonal. A ativação de mTORC1 desencadeia a via de sinalização HIF1 α e C-MYC conhecidos por aumentar a glicólise em células tumorais. Desse maneira, a célula de Schwann aumenta a expressão dos genes PFKFB3 (fosfofrutoquinase-1) e LDHA (LDH-M), codificantes de enzimas da via glicolítica, aumentando a oferta de lactato e piruvato, que se dirigem para o axônio lesionado via MCT, que posteriormente os utiliza como fonte energética (Babetto et al., 2020)

Portanto, as células da glia fornecem suporte trófico e energético ao axônio, auxiliando em períodos de maior demanda energética e após a lesão, mas também contribuem para o dano axonal, seja pela redução da atividade protetora ou liberação de componentes tóxicos (Bouçanova & Chrast, 2020).

1.4 Hanseníase

1.4.1 Aspectos gerais da doença e epidemiologia

Popularmente conhecida como “lepra”, a hanseníase é uma das doenças mais antigas que se tem registro no mundo. É causada pelo patógeno intracelular *Mycobacterium leprae*, conhecido por afetar o nervo periférico graças a sua capacidade de infectar as células de Schwann e macrófagos (Scollard et al., 2006). No Brasil o preconceito sofrido pelos que desenvolveram a doença foi tanto que, a fim de minimizá-lo, em 1995 a lei nº 9.010 oficializou a mudança do nome da doença para hanseníase (Femina et al., 2007). Grande parte da discriminação era associada à forma de contágio da doença, devido a pregressa narrativa religiosa atribuindo-a como punição à profanação carnal, além é claro pela própria falta de informação do mecanismo de transmissão (Femina et al., 2007).

A partir da detecção de *M. leprae* viável nas secreções nasais feito por diferentes grupos de pesquisa, sabemos que a transmissão se dá principalmente por essa via (Job et al., 2008; Fadlitha et al., 2019). Pessoas acometidas pela doença podem desenvolver lesões cutâneas onde o *M. leprae* é observado. Assim, o contato direto com a pele lesionada representa mais uma forma de disseminação da doença (Silva et al., 2013). O homem não é único hospedeiro natural do *M. leprae*, sabe-se que tatus e esquilos-vermelhos também são suscetíveis à infecção e desenvolvimento da doença (Balamayooran et al., 2015; Schilling et al., 2019). A transmissão interespecíes do patógeno foi sugerida pelo trabalho de Truman e col. (2011), no qual foi observado por sequenciamento a mesma cepa de *M. leprae* parasitando o homem e o tatu.

De acordo com o boletim da Organização Mundial da Saúde (OMS), Índia, Indonésia e Brasil foram responsáveis por cerca de 80% dos novos casos da doença em 2018. Conforme é possível observar no mapa abaixo (figura 18), o Brasil é o país que reporta o maior número de casos na América Latina, representando 93% dos novos casos nessa região.

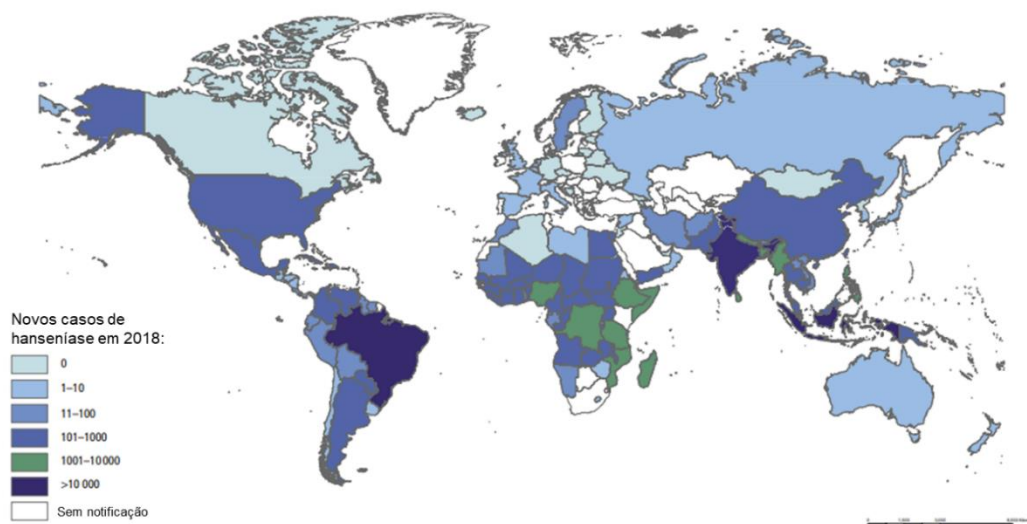


Figura 18. Mapa dos novos casos de hanseníase no mundo em 2018. O mapa representa os dados recebidos de 159 países pela OMS. As regiões com maior detecção de casos em 2018 foram a Índia, o sudeste asiático e o Brasil. Retirado de (World Health Organization, 2019).

Segundo o boletim do ministério da saúde, a prevalência da doença em homens é aumentada de forma gradativa com a idade. Ainda, a doença afeta em maior número pessoas autodeclaradas pardas e com ensino fundamental incompleto (Ministério da Saúde, 2020). A distribuição de casos da doença no Brasil não é uniforme, regiões como norte, nordeste e centro-oeste apresentam índices maiores da doença (Ministério da Saúde, 2020).

Nesse contexto, evidências recentes têm discutido o papel dos insetos como possíveis vetores do patógeno. Neumann e col. (2016) observaram que a viabilidade do *M. leprae* é mantida por pelo menos 20 dias no trato digestivo de *Rhodnius prolixus*, popularmente conhecido como barbeiro. O bacilo também é capaz de permanecer no ovário de carrapatos da espécie *Amblyomma sculptum*, além de transmiti-los a sua progênie (Ferreira et al., 2018). Os tatus se alimentam principalmente de insetos, assim, o consumo de insetos infectados pode contribuir para manutenção do *M. leprae*, uma vez que os tatus são hospedeiros naturais.

1.4.2 *Mycobacterium leprae*

Pertencente ao gênero *Mycobacterium*, o *M. leprae* apresenta muitas características comuns às outras micobactérias como o *Mycobacterium tuberculosis*. Ambos são microaerófilos, imóveis e não formam esporos. Por sua morfologia

alongada em forma de bastonete, as micobactérias também são referidas como bacilos. A coloração de Gram não é adequada para a sua identificação, pois as micobactérias apresentam elevado conteúdo lipídico na parede celular, o que impede a entrada dos corantes utilizados neste método. Utiliza-se o método de coloração de Ziehl-Neelsen para a identificação de bacilos álcool-ácido resistente (BAAR), visto que não são descorados pela solução álcool-ácida, mantendo-se avermelhados pela fucsina (Scollard et al., 2006).

O *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório, ou seja, a célula hospedeira é essencial para a sua sobrevivência. Isso reflete na incapacidade do bacilo em crescer em cultura axênica (Truman & Krahenbuhl, 2001). Seu cultivo pode ser feito através da inoculação em camundongos atímicos (figura 19).

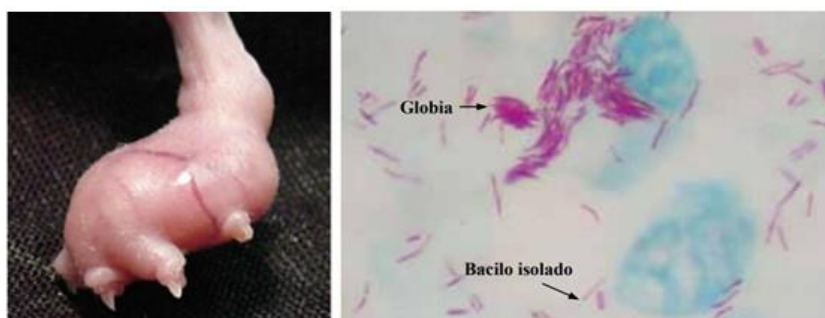


Figura 19. Imagem do local da inoculação de *M. leprae*. O coxim plantar do camundongo nude após cerca de 6 meses da inoculação de *M. leprae* (esquerda) e imagem de microscopia dos bacilos álcool ácido resistentes, onde o *M. leprae* é muitas vezes observado formando agregados chamados de globia (Scollard et al., 2006 e Ministério da Saúde, 2010).

Conforme mostrado na figura 20, o envelope celular do *M. leprae* é constituído por membrana plasmática, parede celular, folheto externo de pseudo bicamada e cápsula (Vissa & Brennan, 2001). A membrana plasmática é a camada mais interna comum a outras bactérias. Acima se encontra a parede celular rica em peptidoglicano e ácido micólicos. Os ácidos micólicos são formados por ácidos graxos de cadeia longa e proporcionam a alta hidrofobicidade do envelope celular (Vissa & Brennan, 2001).

Na parede o peptidoglicano é unido por ligação covalente ao polissacarídeo arabinogalactana (AG) que tem sua porção externa esterificada com ácidos micólicos. O monomicolato de trealose (TMM) é sintetizado no citoplasma e acetilado na parede celular, formando o ácido micólico. Além disso, os glicolipídios lipoarabinomanana

(LAM) e seu precursor lipomanana (LM), ambos ancorados à membrana plasmática, atravessam a parede celular (Vissa & Brennan, 2001).

O folheto externo da pseudo bicamada e a cápsula contém os glicolipídios ftiocerol dimicocerosato (PDIM) e o glicolipídio fenólico 1 (PGL-1). Este último não é encontrado em outras micobactérias e consiste na principal molécula associada ao tropismo do bacilo por células de Schwann. Além disso, a cápsula também apresenta fosfolipídios e fosfatidilinositol manosídeo (PIM) (D. M. Scollard et al., 2006; Vissa & Brennan, 2001).

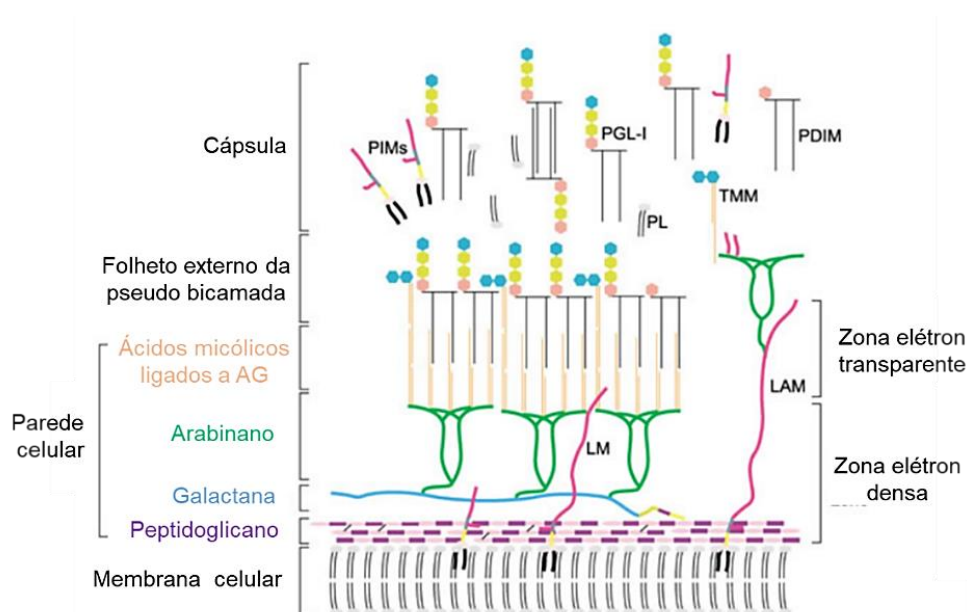


Figura 20. Principais componentes do envelope celular do *M. leprae*. Acima da membrana plasmática, a parede celular é constituída por peptidoglicano e arabinogalactano, que formam a zona elétron densa, enquanto a pseudobicamada com ácidos micólicos ligados aos terminais do arabino formam a zona elétron transparente. O folheto/membrana externo (a) é composto por mais ácidos micólicos bem como seus precursores monomicolato de trealose (TMM) e ftiocerol dimicocerosato (PDIM). Na cápsula estão presentes o glicolipídio fenólico 1 (PGL-1), lipoarabinomanana (LAM), fosfatidilinositol manosídeo (PIM) e lipomanana (LM) (Vissa & Brennan, 2001).

A partir do sequenciamento do genoma do *M. leprae* em 2001 foi possível observar o grande número de pseudogenes e redução de vias catabólicas, principalmente em comparação com o *M. tuberculosis*. Foi estimado por Gomes-Valero e col. (2017) que essas duas micobactérias divergiram há 66 milhões de anos. De acordo com Cole e col. (2001), 40% do genoma do *M. leprae* corresponde a pseudogenes, em que vias anabólicas mantiveram-se mais conservadas, como as envolvidas na síntese de moléculas pequenas (aminoácidos, purinas, pirimidinas e

ácido graxo) e de macromoléculas (RNA/DNA, proteínas e lipídios do envelope celular).

Por outro lado, genes da categoria do metabolismo energético e catabolismo parecem ter sido os mais afetados pela redução genômica. As duas micobactérias são observadas em células espumosas ou também chamadas de células de Virchow, marcadas pelo intenso acúmulo de lipídios em organelas especializadas, os corpúsculos lipídicos (do inglês “lipid droplet”- LD). Nesse contexto, a maioria das bactérias intracelulares obtém como fonte energética a β -oxidação de lipídios do hospedeiro, no caso do *M. leprae*, esse processo parece ter sido prejudicado. Em todo seu genoma, o bacilo possui dois genes codificantes de lipases, enzimas responsáveis pela hidrólise lipídica, em contraste com mais de vinte lipases descritas em *M. tuberculosis* (Aguilar-Ayala et al., 2017; Cole et al., 2001).

Sabe-se que o colesterol, um dos lipídios mais abundantes nos corpúsculos, é degradado pelo *M. tuberculosis* e utilizado como fonte energética e para a biossíntese de lipídios do envelope celular (Pandey & Sasseti, 2008). Foi demonstrado que apesar do *M. leprae* induzir a biogênese de corpúsculo em macrófagos e células de Schwann, o mesmo não é capaz de utilizar o colesterol como fonte de carbono, degradando-o somente até colesteno. Segundo Marques et al. (2015) algumas das hipóteses que beneficiariam o bacilo em preservar a degradação do colesterol até colesteno baseiam-se na possibilidade da célula hospedeira em oxidar a colesteno, modulando a fluidez da membrana da célula hospedeira, facilitando sua entrada.

Além disso, o *M. tuberculosis* também utiliza acetato como fonte de carbono, contudo, todos os genes envolvidos no metabolismo do acetato estão inativos em *M. leprae* (Cole et al., 2001). Nesse contexto de restrição energética, a glicólise e o ciclo do ácido tricarbóxico parecem ser importantes, pois são conservados no bacilo. As reações anapleróticas para o restabelecimento de intermediários do ciclo também foram afetadas pela perda da enzima málica e a presença de apenas uma citrato liase (Cole et al., 2001).

1.4.3 Manifestações clínicas

1.4.3.1 Sinais e sintomas dermatológicos

A hanseníase apresenta um espectro amplo de manifestações clínicas. Ao longo da história da doença, algumas classificações foram propostas para uniformizar o seu diagnóstico. A classificação de Ridley e Jopling utilizou aspectos bacteriológicos, clínicos, imunológicos e principalmente histopatológicos para organizar as manifestações em cinco formas clínicas com dois polos distintos. Pessoas classificadas no polo Tuberculóide (TT) apresentam poucas lesões na pele, em geral circular com a borda delimitada e o centro mais claro. Esse polo é marcado pela exacerbada resposta imune mediada por células. Em lesões de pele há prevalência de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 (interleucina-2), IL-12 (interleucina-12), IL-15 (interleucina-15) e IFN- γ (interferon γ). Em consequência da eficiência da resposta imune, é rara a observação de bacilos no diagnóstico desta forma clínica (Ministério da Saúde, 2017; Park et al., 2016; Modlin, 1994).

Em contrapartida, o polo Lepromatoso (LL) é caracterizado pela presença de manchas na pele sem bordas definidas. O paciente geralmente apresenta a pele seca e avermelhada, com presença de pápulas e nódulos. A resposta imune predominante no polo LL é a Th2, com predominância nas lesões de pele de citocinas anti-inflamatórias IL-4 (interleucina-4), IL-5 (interleucina-5) e IL-10 (interleucina-10). A ineficiência no controle do *M. leprae* faz com que a forma clínica LL seja a mais contagiosa da doença. Entre os polos, existem as formas clínicas descritas como “borderlines”: “borderline borderline” (BB), “borderline lepromatoso” (BL) e “borderline tuberculóide” (BT), determinadas pelas semelhanças entre os dois polos (Ministério da Saúde, 2017; Park et al., 2016; Modlin 1994).

Além disso, mudanças no estado imunológico do paciente podem gerar quadros sistêmicos agudos que podem ser desenvolvidos antes, durante ou após o tratamento da doença. Esses quadros são conhecidos como reação reversa (reação do tipo 1) e eritema nodoso hansênico (reação do tipo 2). Na reação do tipo 1 ocorre o aumento ou surgimento da resposta imune celular em resposta a presença de antígenos do *M. leprae*, assim, com exceção do polo TT, pacientes com as demais formas clínicas podem desenvolver o quadro inflamatório (Pandhi & Chhabra, 2013; D. M. Scollard et al., 1994). Em contrapartida, segundo Pinheiro e col. (2018), a reação do tipo 2 é refletida pela interação entre a imunidade inata e celular, com ocorrência em cerca de 50% dos pacientes do polo LL. O esquema simplificado das formas clínicas da doença é mostrado na figura 21.

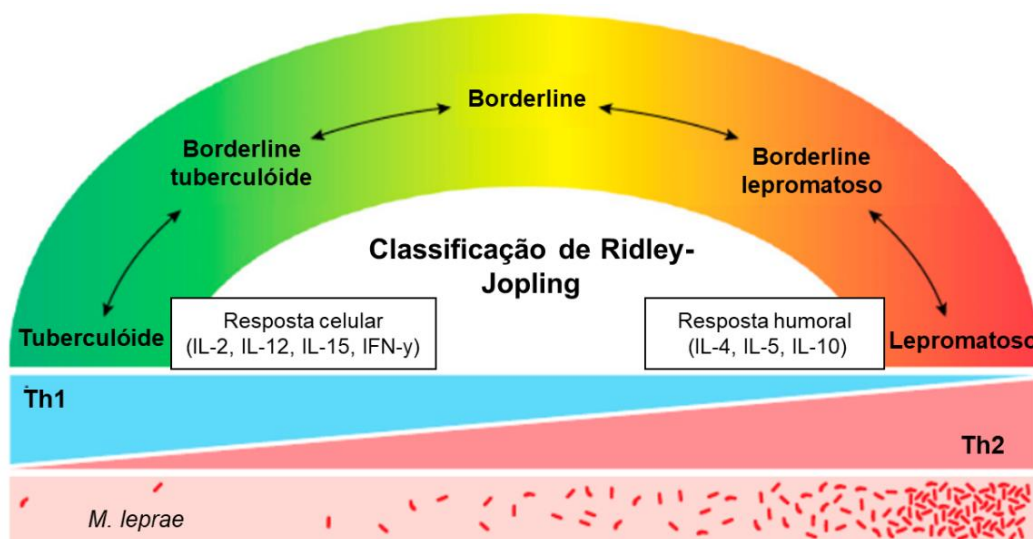


Figura 21. Formas clínicas da Hanseníase. O polo Tuberculóide é caracterizado pela resposta imune eficaz contra o bacilo, com perfil de citocinas Th1 e presença de poucos bacilos nas biópsias. A resposta imune ineficaz ao bacilo é observada no polo Lepromatoso da doença com perfil de citocinas Th2 e alta carga bacilar. As formas clínicas *Borderline* são consideradas limítrofes entres os polos (Park et al., 2016).

Para facilitar o diagnóstico e tratamento da hanseníase, a OMS estabeleceu um sistema de classificação da doença baseado na carga bacilar e no número de lesões. Pessoas que apresentam até cinco lesões de pele e índice baciloscópico (IB) negativo são descritas como paucibacilares, correspondendo às formas clínicas TT e BT. Em contrapartida, a partir de seis lesões de pele ou baciloscopia positiva, o doente é classificado como multibacilar, consistindo as formas clínicas LL, BL e BB (Ministério da Saúde, 2010).

1.4.3.2 Neuropatia hansênica

Pacientes classificados em qualquer forma clínica citada acima podem apresentar envolvimento neural em algum nível. O dano neural pode desenvolver-se afetando apenas um nervo (mononeuropatia simples), dois ou mais nervos em regiões distintas (mononeuropatia múltipla) ou diversos nervos em regiões adjacentes e/ou com distribuição difusa (polineuropatia) (David M. Scollard et al., 2015; Swift & Sabin, 1998).

Entre os nervos mais afetados estão o auricular, fibular comum, mediano, radial tibial e ulnar (figura 22). Os nervos cranianos também são afetados pela doença, de acordo com Kumar e col. (2006), 10-17% dos pacientes apresentam envolvimento nos nervos facial e trigêmeo, principalmente em seus ramos nervosos. O comprometimento desses nervos resulta na diminuição da capacidade de fechar os olhos (logofalmo), córnea com aspecto seco e sem brilho (xerose corneal) e fraqueza dos músculos faciais (Swift & Sabin, 1998).

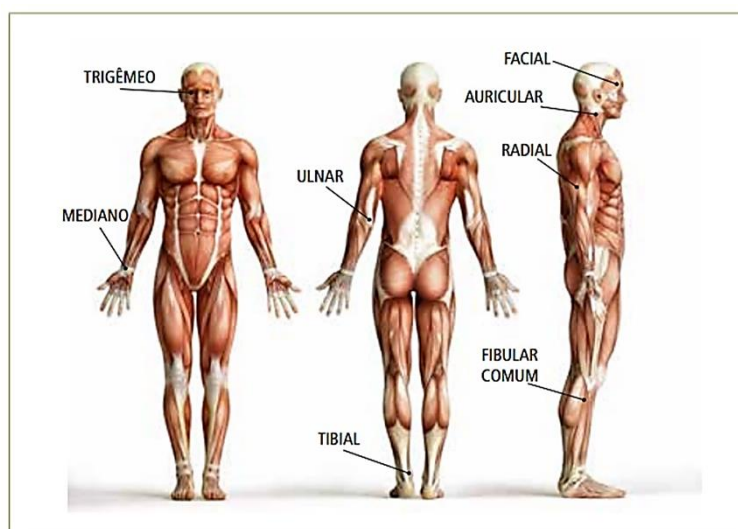


Figura 22. Localização dos principais nervos afetados na hanseníase. (Ministério da Saúde, 2017).

A manifestação neurológica característica da doença é a mancha hipopigmentada com perda ou redução de sensibilidade, devido ao acometimento inicial de fibras pequenas do tipo C, responsáveis por sensações de dor e temperatura (Vashisht et al., 2014). Frequentemente é observado o espessamento do nervo próximo a essas regiões com hipoalgesia (figura 22) (Ministério da Saúde, 2017). A neuropatia também causa disfunções motoras e autonômicas. A disfunção motora é

observada pela fraqueza do(s) músculo(s) associado(s) ao nervo afetado, enquanto as perturbações nos troncos nervosos causam disfunção autonômica com perda de funções vasomotoras e sudomotoras, culminando no ressecamento da pele, deixando-a mais susceptível a infecções oportunistas (Wilder-Smith et al., 2000).

O diagnóstico precoce do comprometimento neural é importante para que o caso não evolua à incapacidade física e deformidade (figura 23). As disfunções motoras, sensoriais e autonômicas podem ser revertidas pelo tratamento, no entanto, em casos tardiamente diagnosticados, o nervo pode ser totalmente destruído, com perda irreversível de sua função (Swift & Sabin, 1998).



Figura 23. Sinais clínicos que indicam o envolvimento dos nervos na hanseníase. Esses sintomas podem ser revertidos pelo diagnóstico precoce e tratamento (Ministério da Saúde, 2017).

Em 2018 o Brasil registrou 2.109 novos casos de incapacidade e grau 2, mantendo-se em segundo lugar mundial nessa classificação em que o dano é irreversível (World Health Organization, 2019). Infelizmente trabalhos publicados de levantamentos da região norte do país têm demonstrado que o número de pessoas com incapacidades pela doença parece ser maior que o oficial. Foi relatado por Bandeira e col. (2017) casos de incapacidade física provocada pela doença em 17.1% das pessoas analisadas, incluindo em menores de 15 anos, conforme exibido na imagem 24. O estudo foi conduzido no estado do Pará, no norte do país, região com maior número de casos por habitante.



Figura 24. Incapacidades irreversíveis geradas pela doença. Da esquerda para direita, mão em “garra” provocada por lesão do nervo ulnar no paciente de apenas 8 anos de idade. Na figura do meio o paciente foi diagnosticado com lesão no nervo popliteal, resultando no pé esquerdo “caído”, com perda de sensibilidade do dorso do pé. Na direita, paciente com incapacidade de estender a articulação do pulso, com lesão no nervo radial (India, 2009; Ministério da Saúde, 2017).

Nos nervos afetados, o *M. leprae* é visto dentro das células de Schwann e em macrófagos espumosos, enquanto é raramente observado no axônio (Hess & Rambukkana, 2019). Sabe-se que a forma clínica está associada ao agravamento da lesão neural. Pessoas classificadas como paucibacilares apresentam uma resposta imune mais eficiente ao bacilo, essas pessoas geralmente apresentam mononeuropatia marcada pela presença de infiltrados inflamatórios (Wilder-Smith & Van Brakel, 2008). Os episódios reacionais (tipo 1 e 2) também são ligados a maior reatividade aos antígenos micobacterianos, podendo ocorrer quadros agudos de neurite. Por outro lado, a polineuropatia é mais comum em pacientes multibacilares, nesse caso os estudos acerca do dano se concentram em mudanças morfofuncionais das células de Schwann infectadas (Serrano-Coll et al., 2018).

1.4.4 Diagnóstico e tratamento

Para o diagnóstico da doença é verificado se a pessoa apresenta lesões de pele e, em seguida, é feito o exame de raspado intradérmico das bordas da lesão ou do lóbulo auricular direito. Nesse exame a presença de *M. leprae* é avaliada pelo método de coloração de Ziehl-Neelsen, estabelecendo o índice baciloscópico a partir da contagem de bacilos na lâmina. Além disso, a reação de Mitsuda, feita pela inoculação intradérmica de bacilos mortos pelo calor, é utilizada como medida da imunidade mediada por células ao patógeno. O local onde os bacilos foram inoculados é avaliado após 4 semanas e, quando positivo, forma-se um granumola com mais de 4mm de diâmetro (Fischer, 2017).

Além disso, sinais que indicam o comprometimento neural devem ser avaliados, como o espessamento dos nervos e a diminuição de força muscular/sensibilidade nas áreas próximas ao nervo afetado. Conforme descrito no item 1.4.3.2, as fibras do tipo C são frequentemente afetadas no começo da doença, assim, a avaliação de alterações de sensibilidade térmica e dolorosa são importantes. Além do exame baciloscópico por esfregaço, biópsias de pele e nervos cutâneos podem ser feitas para corroborar o diagnóstico. Nesses casos o método de coloração utilizado é o Faracofite e geralmente são retiradas biópsias dos nervos auriculares maior na lateral do pescoço ou no ramo superficial do nervo radial e ulnar (Ministério da Saúde, 2017; D. M. Scollard et al., 2006). A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) é eventualmente utilizada como forma diagnóstica, detectando a presença de DNA de *M. leprae* nas amostras de biópsia/swab nasal (Alejandra N. Martinez et al., 2006; Alejandra Nóbrega Martinez et al., 2011).

O tratamento da doença é conhecido como poliquimioterapia (PQT) e difere entre as formas clínicas paucibacilar e multibacilar. No caso do paucibacilar, o tratamento consiste na administração mensal de 600 mg de rifampicina na unidade de saúde além da autoadministração de 100 mg diários de dapsona. Ao total, o tratamento nesse caso tem duração de 6 meses. As pessoas diagnosticadas nas formas clínicas multibacilares precisam de 12 meses de tratamento, com administração mensal na unidade de saúde de 100 mg de rifampicina, 100 mg de dapsona e 300 mg de clofazimina. Além disso, é indicado ao paciente a administração diária de 100 mg de dapsona e 50 mg de clofazimina. O tratamento das pessoas que desenvolvem os episódios reacionais envolve a administração de outros fármacos, como prednisona em reações do tipo 1 e talidomina na reação do tipo 2 mediante a verificação do histórico de saúde do paciente (Ministério da Saúde, 2017). Foi demonstrado que após o terceiro dia após o início do tratamento os pacientes não transmitem mais a doença (Lockwood & Kumar, 2004).

1.5 Mecanismos envolvidos na lesão neural

Apesar da hanseníase ser uma doença milenar, os mecanismos que levam a neuropatia associada a doença não estão completamente compreendidos. Até o momento a principal explicação para os casos multibacilares é atribuída a capacidade do *M. leprae* em infectar a célula de Schwann e causar sua desmielinização. Além disso, como a inflamação perineural é comumente observada em biópsias de nervos,

a contribuição dos mediadores inflamatórios para a lesão tem sido atribuída como um mecanismo indireto observado principalmente nos pacientes paucibacilares (David M. Scollard et al., 2015; Serrano-Coll et al., 2018).

Acredita-se que o *M. leprae* tem acesso aos nervos a partir do trato respiratório, pois é a principal via de contágio descrita (Job et al., 2008; Rees & McDougall, 1977; Silva et al., 2013). No epitélio respiratório o patógeno pode alcançar vasos sanguíneos mais próximos, passando pela membrana basal e o tecido conjuntivo subjacente. Uma vez no sangue, o *M. leprae* poderia se difundir pelo corpo e chegar aos troncos nervosos com maior facilidade (Serrano-Coll et al., 2018). Essa hipótese é corroborada pelo isolamento de bacilos no sangue de pacientes multibacilares e posterior infecção no *coxim* plantar de camundongos, provando a existência de bacilos viáveis no sangue no período da coleta (Drutz et al., 1974; Lane et al., 2006). No entanto, o *M. leprae* parece não ficar muito tempo no sangue, inúmeros trabalhos utilizaram a detecção de DNA do bacilo, o que, ao contrário do RNA, por si só não indica a presença de patógenos viáveis.

Por outro lado, o *M. leprae* possui adesinas que se ligam ao colágeno tipo I, principal componente da matriz extracelular do epineuro (Dias et al., 2012). Desse modo, ainda na cavidade nasal o bacilo poderia ter acesso aos nervos cranianos sem passar pelo sangue. Nas células de Schwann o *M. leprae* foi descrito por interagir com os componentes da lâmina basal, promovendo a reorganização do citoesqueleto celular e sua internalização na célula hospedeira por fagocitose (Alves et al., 2004).

Assim como o encontrado em outros tipos celulares, os principais componentes da lâmina basal da célula de Schwann são laminina, nidogênio, colágeno e proteoglicano. Foi demonstrado que o PGL-1 se liga à cadeia α da laminina 2 e que essa é predominante expressa por células de Schwann, o que pode explicar o tropismo do bacilo por essas células (Hess & Rambukkana, 2015; Previtali et al., 2003). Sabe-se que essa cadeia da laminina se ancora ao citoesqueleto através do receptor distroglicano, que também já foi demonstrado ligado ao *M. leprae* na presença de laminina (F. Saito et al., 1999). Como consequência dessa interação, ocorre a ativação da via fosfatidilinositol 3-quinase (do inglês “phosphoinositide 3-kinase-PI3K”), que é responsável pela reorganização do citoesqueleto de actina, permitindo a fagocitose e internalização do *M. leprae* na célula de Schwann (figura 25).

Além da interação do *M. leprae* com a lâmina basal da célula de Schwann, foi demonstrado por Tapinos e colaboradores (Tapinos et al., 2006) que o patógeno se liga ao receptor ErbB2 na membrana plasmática da Schwann e desencadeia a ativação de vias proliferativas não observadas nas células maduras. As células de Schwann reprogramadas podem facilitar a disseminação do *M. leprae* no nervo, uma vez que a transferência de bacilos para fibroblastos foi observada de forma mais eficiente a partir de células reprogramadas (Hess & Rambukkana, 2015).

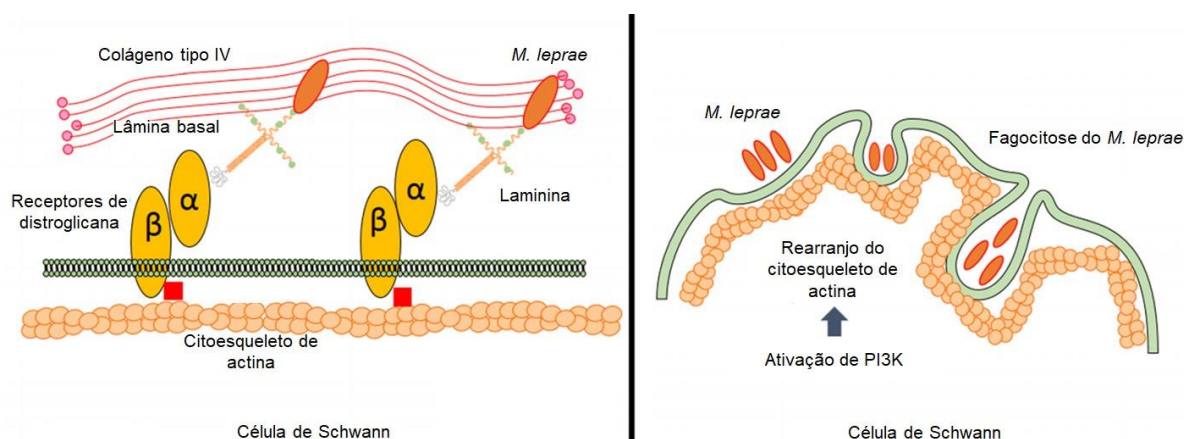


Figura 25. Interação do *M. leprae* com componentes da lâmina basal da célula de Schwann. Na lâmina basal o *M. leprae* se liga a laminina, que, por sua vez, interage com os receptores de distroglicano. Essa interação ativa PI3K e promove a rearranjo do citoesqueleto de actina das células de Schwann, levando a internalização do *M. leprae* por fagocitose. (Serrano-Coll et al., 2018).

Outra via de sinalização que pode levar a indução da via proliferativa ERK1/2 nas células foi descrita por Ribeiro-Resende e col. (2010). No estudo foi avaliada a expressão do gangliosídeo acetilado 9-O-acetyl GD3, um glicolípido presente nas membranas celulares e abundante no nervo após o dano. A infecção pelo *M. leprae* induziu o aumento significativo na expressão do gangliosídeo em células de Schwann. Ainda, foi observado a co-localização do gangliosídeo com a laminina-2, β-distroglicano e o receptor de ErbB-2 nas células e em nervo de camundongos nude (Ribeiro-Resende et al., 2010). A ligação do *M. leprae* a ErbB-2 induz a via de sinalização de Erk1/2 e de proteínas quinases ativadas por mitógenos (do inglês “mitogen-activated protein kinase”- MAPK), o que por sua vez, induz a superexpressão de ciclina D1 no núcleo da célula de Schwann, regulador do ciclo celular (Tapinos & Rambukkana, 2005). Essa via de sinalização culmina na transdiferenciação de células de Schwann, consequentemente, levando à desmielinização.

Foi sugerido por Serrano e col. (2018) que a via de sinalização notch também pode estar envolvida na desmielinização, pois a ciclina D1 inibe Numb (do inglês *protein numb homologue*), antagonista natural da sinalização de notch, levando à expressão dos fatores de transcrição Hes1, Hes5 e Hey1, reguladores de células progenitoras. Assim, esse caminho leva à desmielinização pelo contato direto do *M. leprae* nas células de Schwann (figura 26).

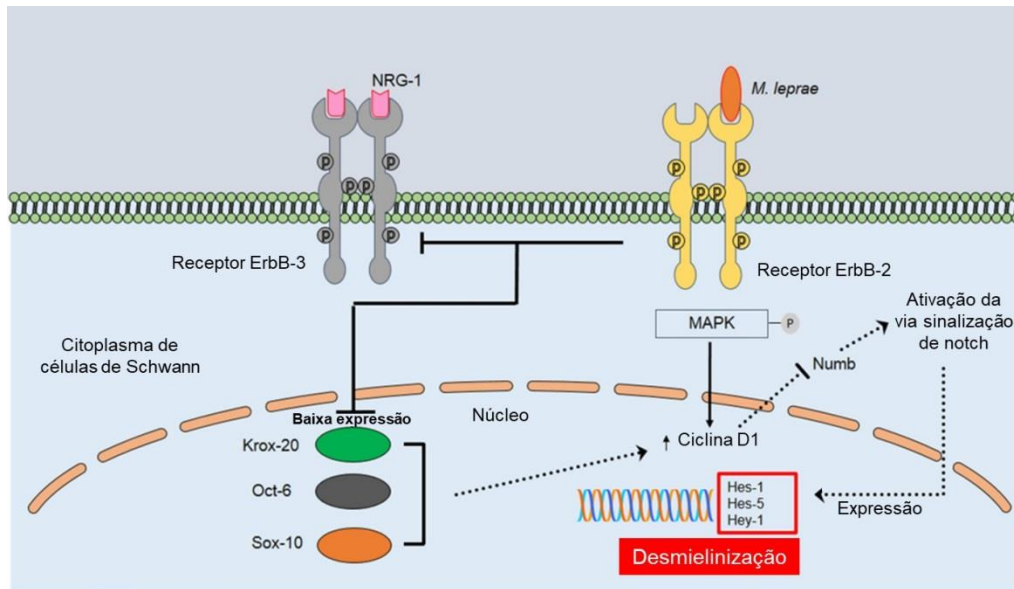


Figura 26. Sinalização celular proposta por desencadear a desmielinização das células de Schwann expostas ao *M. leprae*. A interação do *M. leprae* com o receptor ErbB-2 é sugerida por impedir a heterodimerização do receptor com ErbB-3. A consequência dessa interação é o bloqueio de NRG-1 e inibição da expressão de fatores de transcrição envolvidos na manutenção da mielina (Krox-20, Oct-6 e Sox-10). Quando fosforilado, ErbB-2 também ativa a via de MAPK, o que pode promover a via de sinalização de notch. (Serrano-Coll et al., 2018).

Por outro lado, os pacientes paucibacilares apresentam intensa resposta imune e a observação de granulomas é comum em suas biópsias de nervo. Sabe-se que a infecção do *M. leprae* na célula de Schwann promove a liberação de quimiocinas/citocinas por essas células, atraindo macrófagos ao nervo, o que contribui para a formação do granuloma (Andrade et al., 2016). Surpreendentemente, macrófagos expostos ao *M. leprae* morto apresentam perfil de citocinas diferente dos infectados com *M. leprae* (Yang et al., 2016). A resposta pró-inflamatória pode levar à compressão do nervo e subsequente isquemia que poderia causar perda da função sensorial e motora em pacientes com hanseníase (David M. Scollard et al., 2015).

Foi demonstrado por Madigan (Madigan et al., 2017) em modelo de peixe zebra que o PGL-1 sozinho estimula os macrófagos à sintetizarem óxido nítrico (NO), que induz estresse oxidativo nos axônios, com consequente redução da atividade respiratória mitocondrial e desmielinização. Portanto, muitos modelos *in vitro* e *in vivo* foram propostos para explicar os mecanismos que levam à neuropatia, baseados principalmente na sinalização celular e reprogramação das células de Schwann em resposta ao *M. leprae*, e de forma indireta por mediadores imunes liberados por macrófagos e pelas células de Schwann.

Outra frente para as investigações dos mecanismos envolvidos na neuropatia associada à doença são as mudanças no metabolismo da célula de Schwann. Foi demonstrado por nosso grupo que a infecção *in vitro* promove o aumento da captação de glicose do meio extracelular, a partir da utilização do análogo fluorescente de glicose 2-NBDG. A intensidade da marcação foi proporcional ao aumento da carga bacilar nas culturas, indicando a relação direta dos bacilos viáveis no aumento da glicose. Em contrapartida, a avaliação das vias afluentes à glicólise, como a fermentação e a oxidação na mitocôndria, demonstrou-se drasticamente afetadas. O aumento da expressão dos MCT's nas células de Schwann não correspondeu ao aumento da liberação de lactato ou síntese de piruvato. Além disso, mitocôndrias inchadas foram observadas em axônios nas biópsias de nervo de pacientes (Medeiros et al., 2016). O resumo das mudanças no metabolismo oxidativo das células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* é exibido abaixo (figura 27).

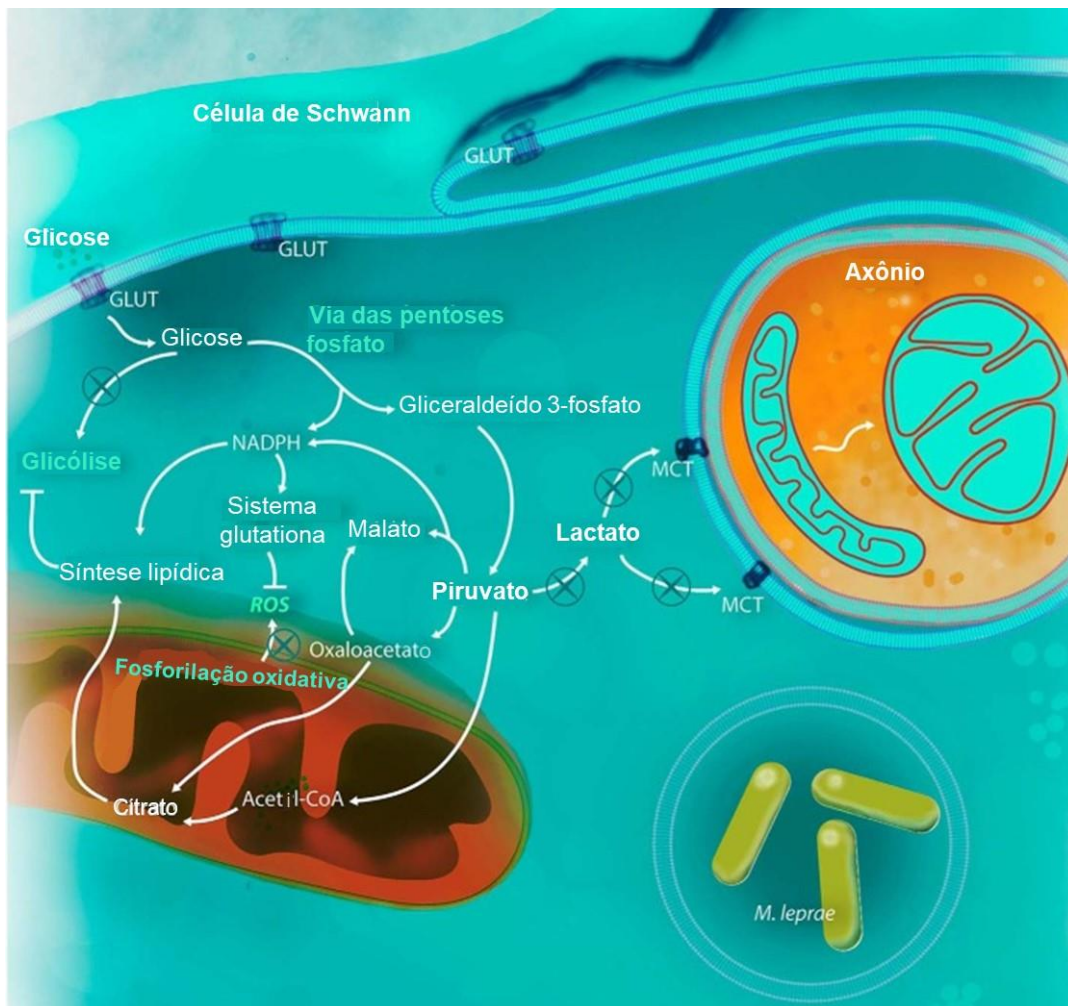


Figura 27. Modulação do metabolismo glicolítico de células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*. O aumento da captação de glicose é seguido pelo aumento da via das pentoses fosfato, gerando NADPH utilizado na síntese lipídica. O piruvato gerado pela via das pentoses é convertido em malato e acetil-CoA em vez de lactato, impactando a mitocôndria axonal. O piruvato é convertido em citrato, aumentando a síntese lipídica e interrompendo na mitocôndria das células de Schwann o ciclo do ácido tricarboxílico e a cadeia respiratória (Medeiros et al., 2016)

Desse modo, diante do que foi descrito até agora sobre a importância do acoplamento metabólico neurônio-glia, formulamos a hipótese de que alterações no metabolismo oxidativo das células de Schwann promovidas pelo *M. leprae* contribuem ativamente para o desenvolvimento da neuropatia hansênica, através da privação energética axonal. Assim, nos propomos a avaliar de maneira global as mudanças promovidas pela infecção no metabolismo das células gliais e a compreensão da natureza dos nutrientes que o *M. leprae* obtém a partir de seu hospedeiro, uma vez que permanecem pouco conhecidas. Além disso, exploramos os impactos das alterações no metabolismo de células de Schwann em neurônios, como um modelo

experimental para mimetizar o ambiente do sistema nervoso periférico, onde os axônios dos neurônios estão envoltos pelas células de Schwann.

2. Justificativa

Anualmente são registrados no Brasil casos de incapacidade física em decorrência da hanseníase. Apesar de ser reconhecida por afetar o sistema nervoso periférico, os mecanismos envolvidos na histopatologia da doença são diversos e poucos elucidados. No sistema nervoso periférico, as células de Schwann são essenciais na manutenção e reparo axonal, através da regulação de fatores de transcrição pró-mielínicos, bem como na secreção de substratos para o ciclo do ácido cítrico. Portanto, a interrupção da homeostase do metabolismo glial gerado pelo contato do *M. leprae* pode contribuir para o acometimento neural, representando um mecanismo ainda não avaliado na doença. O desvio do carbono da glicose captada em excesso pelas células de Schwann infectada é sugerido pelo aumento na expressão da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) nas células e em biópsias de pele de pacientes com hanseníase. Todavia, não se sabe se o *M. leprae* é capaz de utilizar a glicose da célula hospedeira como fonte de carbono. Portanto, a compreensão do impacto dessas alterações no metabolismo da célula de Schwann no contexto neural é a chave para que no futuro mais terapias estejam disponíveis para o controle da neuropatia hanseniana.

3. Objetivo

3.1 Objetivo geral

- Analisar o impacto do remodelamento do metabolismo central da célula de Schwann infectada pelo *M. leprae* sobre a fisiologia neuronal.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar alterações no fluxo de carbono da célula de Schwann infectada, através da análise da abundância dos isótopos de ^{13}C presentes nos diferentes aminoácidos da célula hospedeira após exposição à glicose $^{13}\text{C}_6$, identificando alterações nas rotas de catabolismo da glicose nas células infectadas;
- Identificar a abundância e a posição dos isótopos de ^{13}C presentes nos diferentes aminoácidos do patógeno purificado de células de Schwann infectadas, identificando os principais intermediários da glicose envolvidos no anabolismo proteico de *Mycobacterium leprae* no interior da célula hospedeira;
- Investigar a presença e caracterizar a natureza de fatores neurotóxicos em sobrenadantes de células de Schwann infectadas pelo *Mycobacterium leprae* em neurônios periféricos primários;
- Caracterizar o destino do lactato em células de Schwann infectadas pelo *Mycobacterium leprae* utilizando lactato marcado isotopicamente com ^{14}C ;

4. Materiais e métodos

4.1 Cultivo de células de linhagem

Foram cultivadas células de Schwann da linhagem ST8814 e neurônios da linhagem SK-N-AS (ATCC-2137). A linhagem de neuroblastoma foi adquirida do banco de células americano ATCC (do inglês “American Type Culture Collection”) pela Dr. Myrna Cristina Bonaldo, chefe do Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus do Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz), e foram gentilmente cedidas ao Laboratório de Microbiologia Celular (Lamicel). O protocolo de manutenção descrito a seguir foi o mesmo utilizado nas duas linhagens, uma vez que ambas são aderentes.

O estoque celular é mantido criopreservado em nitrogênio líquido e, para o descongelamento, o criotubo foi descongelado em banho-maria à 37°C. Em seguida, as células diluídas junto a solução de congelamento foram adicionadas aos poucos em um tubo de plástico com 10 mL de meio RPMI 1640 (Gibco, ref: 31800-022) no caso das células de Schwann e, meio DMEM-F12 (Gibco, ref: 12500-062) para os neuroblastomas, ambos suplementados com 10% de soro fetal bovino (Cripion). Para a sedimentação das células, o tubo é centrifugado a 400x g por 10 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante é separado do sedimento ou pellet contendo as células, que, subsequentemente, são expostas ao corante azul de tripan (Sigma, ref: T8154) e contadas na câmara de Neubauer. Na estufa as células foram mantidas sob condições padronizadas a 37°C e 5% de CO₂.

Para o repique da garrafa, o meio de cultura é removido, seguido do acréscimo de tampão fosfato-salino (PBS) (Gibco, ref: 21600-010) para a retirada de todo resquício de soro e meio de cultura. Foi adicionada a enzima tripsina a 0,125 % (LGC Biotecnologia, ref: BR3004301) a 37°C e as células foram mantidas na estufa por cerca de 1 minuto e meio. Para o bloqueio da ação da enzima, a garrafa foi avolumada até 10 mL de meio com 10% de soro fetal bovino, seguido de centrifugação a 1500 por 10 minutos a temperatura ambiente e submetidas a contagem conforme descrito.

4.2 Purificação e cultivo de neurônios primários

Para a obtenção da cultura de neurônios primários, foi utilizado o gânglio da raiz dorsal de camundongos BALB/c neonatos, perante a aprovação da licença da comissão de ética no uso de animais (CEUA) 033-2015. Os neonatos foram decapitados com tesoura cirúrgica de ponta fina com 5 cm e, posteriormente, foi feito um corte longitudinal na região dorsal paralelo a coluna vertebral. Com auxílio da pinça, a medula espinal foi retirada para que os gânglios pudessem ser visualizados. Todo o procedimento dissecação e retirada dos gânglios foi feito com o auxílio da lupa/estereomicroscópio (Leica EZ4).

Os gânglios extraídos foram colocados em meio L-15 (Sigma, ref: L4386) e centrifugados por 5 minutos a 300 x g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e foi adicionado ao pellet 200µL do tampão de cloreto de amônio-potássio (ACK), por um minuto para a lise de hemácias. Após o período, foi adicionado novamente o meio L-15 seguido de centrifugação a 300 x g em temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 2 mL tripsina 0,125% ao pellet para a dissociação por 30 minutos na estufa a 37°C, agitando manualmente o tubo a cada 10 minutos. A neutralização da ação da tripsina foi feita através da adição de 2mL de meio DMEM/F12 com 10% de soro fetal bovino. Além disso, a dissociação mecânica foi feita passando o conteúdo 10 vezes na agulha 21g (Solidor, 21G x 1 1/4) e, posteriormente, mais 10 vezes na agulha 26g (BD, 26G x 1/2). Em seguida, restos de tecidos são removidos com o auxílio de um filtro 40µm. O sobrenadante filtrado é centrifugado a 300 xg a temperatura ambiente por 10 minutos e, após a remoção do sobrenadante, é acrescentada ao pellet formado 200µL de ACK. Foram adicionados 10 mL de meio DMEM/12 suplementado de soro e os neurônios foram centrifugados mais uma vez. O ACK e o meio foram removidos e foi acrescentado ao pellet meio de DMEM/F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 5% de PEES (LGC, ref: 031-199T) e 100nM de NGF (do inglês “neuronal growth factor”) (Gibco, ref: 13257-019).

Por fim, os neurônios foram contados na câmara de Neubauer e adicionados em placa de 24 poços com lamínula de vidro (Knittel Glass, ref: ISSO 8255/1). Para a adesão dos neurônios, a placa foi previamente tratada com 10 µM poli-D-lisina (Sigma, ref: P6407) e 10 µM laminina (ThermoFisher, ref: 23017015) para a adesão dos neurônios. Os neurônios foram contados na câmara de Neubauer e adicionados em placa de 24 poços com lamínula de vidro (Knittel Glass, ref: ISSO 8255/1). Para a adesão dos neurônios, a placa foi tratada no dia anterior ao plaqueamento com 10 µM

poli-D-lisina (Sigma, ref: P6407) e 10 μ M laminina (ThermoFisher, ref: 23017015) e deixada na estufa a 37°C.

4.3 Tratamento de neurônios primários com sobrenadante de células de Schwann

Após as etapas descritas no item 4.2, no mesmo dia do plaqueamento, foram adicionados aos neurônios o sobrenadante de células de Schwann. Neurônios de todas as condições receberam 100 nM NGF de forma igual, diluído em meio de cultura. Como os neurônios foram suplementados com o mesmo volume de sobrenadante de Schwann, a concentração final de NGF foi de 50nM. Após 24 horas os neuritos expandidos foram fixados com 4% de paraformol por 20 minutos para a etapa posterior de imunocitoquímica.

4.4 Obtenção de micobactérias

4.4.1 *Mycobacterium leprae*

O *M. leprae* cepa Thai-53 é inoculado no coxim plantar da pata traseira de camundongos congenitamente atímicos (nude). Toda a parte da criação, manejo e infecção dos camundongos é feita pela equipe do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL), Bauru-SP. O modelo de infecção em camundongos segue o procedimento descrito por Charles C. Shepard (1960).

Em um período de aproximadamente seis meses após a inoculação, os camundongos são eutanasiados e suas patas são enviadas para o Lamicel. No laboratório, pele e osso são retirados da pata, restando a parte tecidual, que, seguidamente, é mantido na solução com enzimas colagenase tipo 1 e dispase, DNase e ampicilina, por cerca de 2 horas para que ocorra a digestão do tecido. Após este período, a amostra digerida é lavada com água e, posteriormente, com 0,1 M de hidróxido de sódio (NaOH). A suspensão de bacilos é incubada em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com ampicilina por cerca de 3 horas, sob a temperatura de 33°C.

Por último, é feita a contagem de bacilos seguindo o modelo proposto por Shepard e, a verificação da porcentagem de viabilidade dos bacilos ao final de todo este processo, feito com o kit Live/Dead BacLight (Thermo Fisher Scientific, ref:

L7007). Para todos os experimentos com *M. leprae* foram utilizados bacilos com 80% ou mais de viabilidade.

4.4.2 *Mycobacterium bovis*

A cepa vacinal *M. Bovis* BCG Pasteur 117 foi cultivada a 37°C sob agitação constante por cerca de 3 semanas. Foi utilizado o meio de cultura Middlebrook 7H9 (DIFCO laboratories) suplementado com 10% de Middlebrook ADC (albumina bovina, catalase e dextrose). Para a contagem de bactérias foi adicionado 10 µL da cultura na lâmina de vidro, seguido da fixação por calor e adição de fucsina fenicada. Em seguida, a lâmina foi lavada com água e mantida com a solução álcool-ácido por cerca de 30 segundos. Após a contagem, foi aferida a viabilidade das células pelo teste Live/Dead BacLight. Para os ensaios, as bactérias foram ressuspensas em meio RPMI1640.

4.5 Dosagem de lactato no sobrenadante celular

Para a quantificação de lactato no sobrenadante celular, foi utilizado o kit lactato liquiform (Labtest, ref: 138), seguindo-se as indicações do fabricante. Para o ensaio, foi feita a solução de trabalho misturando 0.8 partes reagente 1, composto por 4-aminoantipirina, com 0.3 partes do reagente 2, composto pela enzima lactato oxidase e N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline (TOOS). O lactato presente no sobrenadante reage com a enzima lactato oxidase, formando piruvato e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). O H₂O₂, por sua vez, reage com N-ethyl-N-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3-methylaniline (TOOS) e 4-aminoantipirina e, catalisado pela enzima peroxidase, forma a quinoneimina que tem absorvância em 550 nm no leitor de microplacas. A intensidade da coloração da solução em contato com a amostra é diretamente proporcional à concentração de lactato na amostra. Como controle, as absorvâncias foram diminuídas do branco. Em seguida, a absorvância das amostras foi dividida pela absorvância do padrão do kit e multiplicada pelo fator de calibração, gerando a concentração de lactato em mg/dL.

4.6 Ensaio de viabilidade celular por MTT

Foi adicionado (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MTT) (5mg/mL) (Sigma-aldrich, ref: M2128) na placa de neuroblastomas após 24

horas de incubação com o sobrenadante de células de Schwann da linhagem ST8814. O volume adicionado de MTT foi de 10% do volume de meio de cultura da placa, ou seja, nas placas de 96 poços com 100µL, foi adicionado 10 µL de MTT. As células foram incubadas com este sal por 3 horas na estufa a 37°C e lidas a 590nm. O MTT tem a coloração amarelada e as células viáveis reduzem-no a formazam, uma reação catalisada por desidrogenases mitocondriais. Na placa, quanto mais granulos arroxeados aparecem, maior a viabilidade celular. Para solubilizar os granulos, foi adicionado 20 µL de DMSO não estéril.

4.7 Imunocitoquímica

4.7.1 Neurônios primários

Após os 20 minutos de fixação com solução de PFA a 4%, as células foram lavadas com PBS e, em seguida, foi adicionado o anticorpo primário marcador de neurofilamento Tuj-1 diluído 1:1000 em solução de bloqueio. Para a solução de bloqueio, foi adicionado 0,1g albumina (do inglês “bovine serum albumin”-BSA), 5 % soro de cabra (do inglês “normal goat serum”-NGS) (Life technologies, ref: PCN 5000) e 0,3% de triton X-100 (Amersham Biosciences, ref: 17-115-01) avolumado em PBS. Após 30 minutos de incubação, a solução contendo o anticorpo primário foi removida e as células lavadas com PBS, seguido da incubação com o anticorpo secundário Alexa488 (Life, ref: A11001) diluído 1:500, durante 30 minutos. Por último os núcleos celulares foram marcados 1 µg/mL de DAPI (Molecular Probes, ref: D1306), durante 1 minuto. As imagens dos neurônios foram obtidas com o uso do microscópio invertido de fluorescência (Zeiss Axio Observer) com a objetiva Plan-neofluar 10X e 20X. A quantificação das imagens foi feita com programa ImageJ, através do plugin Sholl Analysis.

4.7.2 Marcação de células de Schwann com BODIPY

Para a marcação com BODIPY 493/503 (Thermo Fisher, ref: D3922), as células de Schwann foram incubadas com 1 µg/ mL do marcador por 1 hora. Após o período, as células foram lavadas com PBS duas vezes e acrescentado DAPI para a marcação do núcleo. A leitura da fluorescência é feita na própria placa.

4.8 Marcação de células de Schwann com carbono 13 (¹³C)

Foram adicionados 3×10^6 células de Schwann da linhagem ST8814 em garrafas de 175 cm². Após 24 horas do plaqueamento, o *M. leprae* foi adicionado, exceto no grupo controle. A multiplicidade (MOI) utilizada para esse ensaio foi de 100:1, ou seja, 100 bactérias para cada célula de Schwann. Após 48 horas de infecção, o meio foi removido e, em seguida, foi acrescentado meio RPMI1640 sem glicose (Gibco, ref: 2016-11) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2 g de glicose ¹³C marcada por litro (ref: 110187-4-3). As células foram mantidas por mais 72 horas na estufa na estufa a 33°C, visto que é a temperatura ideal para o bacilo.

4.9 Extração de aminoácidos ¹³C por hidrólise ácida

Após a remoção do meio, as células foram lavadas com 3 mL de PBS gelado por garrafa e, em seguida, foi adicionado 3 mL de triton X-100 0,1% para a lise celular. As células foram centrifugadas a 11.000 x g por 5 minutos à 4 °C. O sobrenadante (células de Schwann) e o sedimento (*M. leprae*) resultante da centrifugação foram separados. O pellet foi lavado duas vezes com tampão RIPA (50 nM de Tris-HCl pH 7,5; 1% de Nonidet p40; 0,25% de deoxicolato de sódio e 0,1% de SDS) com inibidor de protease cOmplete (Roche) e, posteriormente, ao pellet e sobrenadante foi adicionado ácido clorídrico (HCL) 6N “overnight”, a 105 °C. No dia seguinte, o conteúdo do tubo foi evaporado usando nitrogênio gasoso e foi acrescentado 1 mL de água nos tubos para transferência dos aminoácidos para tubos de plástico tipo eppendorf, seguido de concentração no SpeedVac (thermo Savant ISS 110).

Como controle, além da leitura dos aminoácidos *M. leprae* purificado a partir das células de Schwann, *M. leprae* incubado em meio axênico também foi avaliado. As amostras foram enviadas para o laboratório Dr. Johnjoe MacFadden, na Universidade de Surrey, em Guilford, onde foram lidas por HPLC acoplado ao espectrômetro de massas, conforme descrito por Beste e col. (2013).

4.10 Incubação de células com lactato

4.10.1 Marcação de células com L-lactato ¹⁴C

Foram utilizadas 7×10^4 células de Schwann por poço em placas de 6 poços e, 24 horas após o plaqueamento, adicionou-se *M. leprae* na MOI 50:1. Após 48 horas de infecção, o sobrenadante foi removido e as células foram mantidas durante 4 horas com meio RPMI1640 sem glicose. Passado o período, o meio de cultura foi removido novamente e foi adicionado meio RPMI suplementado com 5 μ currie de L-lactato ¹⁴C (Perkin Elmes, ref: 1979244) e 2% de soro fetal bovino, permanecendo por mais 72 horas. Ao final, o sobrenadante da cultura foi retirado, centrifugado para a separação de debris celulares e foi feita a sua extração lipídica. Para a obtenção de células de Schwann, foi adicionado 500 μ L de tripsina e posterior inativação com o mesmo volume de soro fetal bovino. As células foram centrifugadas a 400 x g a temperatura ambiente e o conteúdo sedimentado foi ressuspenso em 800 μ L de água. Por fim, as células foram sonicadas 3 vezes por 30 minutos. O conteúdo lipídico do sobrenadante e do lisado celular foi extraído seguindo o item 4.11.

4.10.2 Marcação de células com L-lactato

Foram plaqueadas 5×10^3 células de Schwann em placas de 96 poços. Após 24 horas, adicionou-se *M. leprae* na MOI 50:1, incubando-as por 24 horas com o bacilo. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas por 2 horas com meio RPMI sem glicose e suplementado com 2 % de SFB. Após o período, o sobrenadante foi retirado novamente e, em seguida, adicionado meio RPMI com 2 % de SFB e 100 mg/dL de L-lactato. Após 48 horas as células foram lavadas com PBS e fixadas com 4 % de PFA para a marcação das células com BODIPY e DAPI.

4.11 Extração lipídica pelo método de Bligh & Dyer

A extração lipídica do sobrenadante foi feita utilizando-se o método descrito por Bligh & Dyer (1959). A cada 0,8 mL de sobrenadante, foi acrescentado 1 mL de clorofórmio e 2 mL de metanol, mantendo a proporção 1: clorofórmio; 2: metanol; 0,8 água. O conteúdo foi homogeneizado no vortex a cada 5 minutos por 1 hora. Depois, os tubos foram centrifugados a 3.000 rpm à 4°C por 20 minutos e o sobrenadante foi removido e reservado em outro tubo.

A segunda extração foi feita no pellet, com a adição de 0,5 mL de clorofórmio, 1 mL de metanol e 0,4 mL de água, seguido de homogeneização a cada 5 minutos por 1 h. Passado o tempo, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi removido e unido ao anterior reservado. Para a separação das fases orgânica e aquosa foi adicionado 0,5mL de clorofórmio e 0,5mL de água ao tubo com os sobrenadantes unificados. Os tubos foram homogeneizados no vortex por cerca de 10 segundos e centrifugados a 3.000 rpm à 4°C por 30 minutos. Com o auxílio de uma seringa de vidro ou pipeta pasteur, a fase orgânica (inferior), foi retirada e transferida para outro tubo.

4.12 Cromatografia em camada fina de lipídeos radioativos ¹⁴C

Todos os ensaios com ¹⁴C foram feitos no laboratório de bioquímica de lipídeos, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, em colaboração com a Dr. Georgia Atella. Após a etapa de extração lipídica (item 4.11), os tubos contendo os lipídios em clorofórmio foram evaporados com nitrogênio gasoso e, posteriormente, foi adicionado 20µL de clorofórmio em cada tubo, passando o tubo no vórtex. Para a separação dos lipídios, foi utilizado cromatografia em camada fina (do inglês “thin-layer chromatography”- TLC), onde foi adicionado a cada 5 µL na área correspondente a cada condição. Como controle, nos dois extremos da placa foram não foram adicionadas amostras, mas padrões lipídicos (monoacilglicerol, diacilglicerol, triacilglicerol, ácido graxo, colesterol esterificado, fosfolípido). A placa foi colocada na capela de exaustão e exposta a mistura dos solventes hexano-éter etílico acético (60:40:1) para análise de lipídeos neutros e, seguida, foi corada com vapor de iodo.

Os lipídios corados foram circulados com lápis e enumerados, para a etapa seguinte de raspagem da placa. Os lipídeos foram colocados em tubos com 0,5 mL de líquido de cintilação. A leitura de ¹⁴C foi feita no cintilador do Laboratório de Neuroquímica do Instituto de Biofísica da UFRJ. O cálculo da taxa de contagem β por minuto da amostra (CPMA) para desintegração por minuto (DPM) foi feito baseado na eficiência da leitura levando em consideração padrões rotulados com ¹⁴C. Assim, a radioatividade convertida em dpm foi expressa em fold change em relação ao controle.

4.13 Avaliação de fluorescência por Microscopia de High Content Screening (HCS)

No cytell (GE Healthcare) é possível analisar a fluorescência de imunocitoquímica (fixada) ou biomarcadores com células vivas. Para as células fixadas, o protocolo de imunocitoquímica foi feito na própria placa e, posteriormente, a placa foi colocada no aparelho para a leitura. Foi programada a fotografia de 6-9 imagens por poço, ao final da leitura o resultado foi expresso pelo cálculo entre a intensidade média de fluorescência dividida pelo número de núcleos contados por campo.

4.14 Dosagem de proteína

Para a dosagem de proteínas foi utilizado BCA (Thermo Scientific, ref: 23225) e o ensaio foi feito conforme descrito pelo fabricante. Brevemente, foi utilizada a placa de 96 poços, acrescentando 50 partes do reagente A e 1 parte do reagente B em cada poço, juntamente com a amostra a ser dosada. A curva padrão de albumina foi utilizada como controle do kit. Como kit é colorimétrico, a placa com as amostras foi lida no espectrofotômetro, previamente programado a 562nm de absorbância.

4.15 Eletroforese unidimensional e coloração por nitrato de prata e coomassie

Dez microgramas de proteína foram misturados com o tampão de amostra e fervido por 10 minutos. Para a preparação do tampão de amostra foram utilizados pH 6,8 Tris HCl 156.25 mM, glicerol 25% e β -mercaptoetanol 12.5% e fervido por 10 min. Subsequentemente, as amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida e submetidos a corrida eletroforética a 100v. O stacking gel utilizado foi de 6% e o de corrida 10 %. Todas as etapas foram feitas em condições não desnaturantes, sem a adição de SDS. Após a corrida, o gel foi corado com "Coommassie brilliant blue" (BIO-RAD, R-250) por 1 hora e, em seguida, foi adicionado à solução descorante (10% de metanol e 12% de ácido acético). Para a coloração com prata, o gel foi incubado por 1 hora com a solução fixadora (12% ácido acético, 50% metanol e 50 μ L de formaldeído), em seguida, foi mantido por 20 minutos na solução de 20% de etanol e mais 20 minutos em 30% de etanol. O gel foi mantido por cerca de 1 minuto com 0,2 mg/mL de tiosulfato sódico e, em seguida, por 20 minutos com a solução com 200 mg de nitrato de prata e 75 μ L de formaldeído. Por último, o gel foi incubado com a

solução reveladora (6g carbonato de sódio, 50µ formaldeído e 400 µL tiosulfato a 1mg/mL) e para a parada da reação foi adicionado a solução de fixação.

4.16 Revestimento de Beads com PGL-1

Brevemente, foram utilizados 10µL de beads (Sigma, ref: LB-30) e avolumado para 100µL de tampão bicarbonato de sódio a 0.05 M e pH 9.6. Em seguida, foi adicionado 200µg/mL de PGL-1 (BEI Resources, ref: NR-19342) e o conteúdo foi avolumado com o tampão bicarbonato de sódio para 500 µL. O tubo do tipo eppendorf contendo a solução mantido sob agitação constante por 3 horas em temperatura ambiente. Após o período, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e foi adicionado as beads a solução de 100µL de PBS estéril com 2% BSA, incubando-os por 2 horas. As beads recobertas com PGL-1 foram centrifugadas e ressuspensas em 100µL de PBS estéril. Foram utilizadas beads vazias para o controle dos experimentos, nesse caso, foi adicionado PBS ao invés de PGL-1 as beads e todo o protocolo foi seguido de forma igual.

4.17 Análise do metabolismo central através de fluorescência de células vivas (NBDG e TMRM)

Para a marcação com o análogo de glicose 2-[N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-2-deoxy-D-glucose ou de forma abreviada 2-NBDG (Sigma, ref: 72987) e do marcador de potencial elétrico de membrana tetramethylrhodamine methyl ester perchlorate (TMRM) (Sigma, ref: T5428), primeiramente foi retirado o sobrenadante celular e, em seguida, adicionado as células 25µM de 2-NBDG, incubando-as por 20 minutos com este fluoróforo. Como controle do desacoplamento elétrico da membrana mitocondrial, as células foram incubadas com 25µM de CCCP (Sigma, ref: C2759) 10 minutos antes do acréscimo de TMRM. Após o período, 0,5 nM de TMRM foi acrescentado e deixado por 10 minutos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e levadas ao Cytell para leitura das fluorescências.

4.18 Fracionamento do sobrenadante celular

Para o fracionamento, 10 mL de sobrenadante foram concentrados no speedvac. Foi injetado na coluna superose 6 HD 10/30 (Amersham Biosciences, ref: 52-1768-00) 200µL do sobrenadante concentrado, seguindo os ajustes da corrida: flow rate 0.4

mL/ minuto. A coluna apresenta a faixa de separação ideal de 5000 – 5×10^6 de peso molecular. Foi utilizado tampão fosfato em pH 7 para o fracionamento das amostras. Ao todo, foram coletados 70 tubos. Assim, uma parte das amostras fracionados nos 70 tubos coletados foram agrupados em pools (31-40;41-50;51-60;61-70) para serem adicionados nas culturas de células SK-N-AS. Antes de serem adicionados nas células, os pools foram previamente esterilizados através de filtros 0,22 μm .

4.19 Purificação de exossomos do sobrenadante celular

Foram utilizados 50 mL de sobrenadante de células de Schwann controles e infectadas pelo *M. leprae* para centrifugação a 2.000 x g para sedimentar os detritos celulares. Posteriormente, o sobrenadante foi centrifugado a 11.000 x g durante 30 minutos para a sedimentação de mais debris celulares e microvesículas. Após o período, o sobrenadante foi novamente coletado e submetido a ultracentrifugação de 100.000 x g por 1 hora, onde foram sedimentadas proteínas e os exossomos. O conteúdo sedimentado foi lavado com PBS estéril e submetido a mais uma ultracentrifugação de 1 hora. Por fim, os exossomos foram diluídos em 100 μL de PBS estéril. Para as centrifugações foi utilizada a ultracentrífuga Sorvall RC2-B, do pavilhão Hélio e Peggy Pereira (HPP).

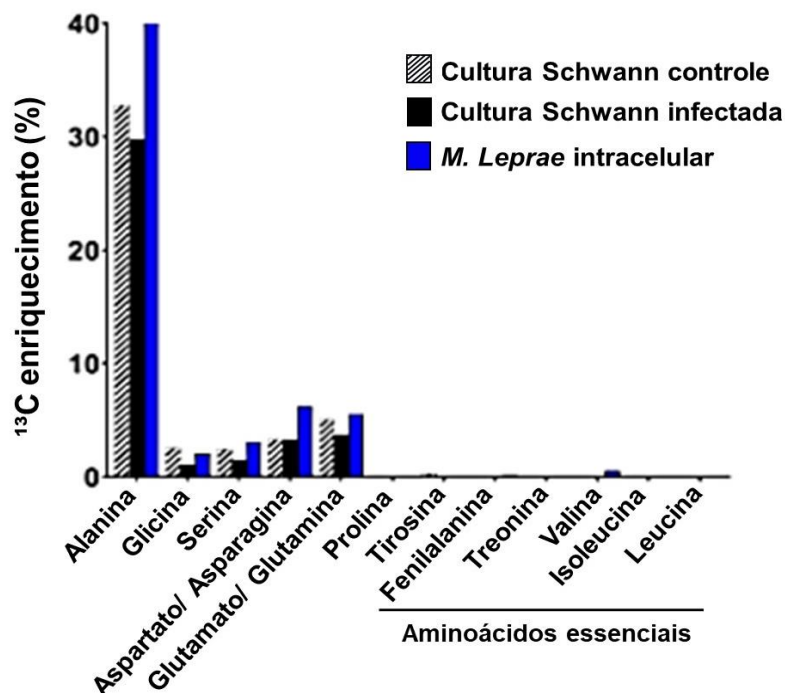
4.20 Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas com o software GraphPad Prism VS 7. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média (SE) e desvio padrão (SD). A estatística foi feita por análise de variância (ANOVA) e teste t, mediante avaliação de distribuição normal nas amostras.

5. Resultados

5.1 Avaliação da rota do carbono da glicose até o anabolismo de aminoácidos

Os aminoácidos celulares foram avaliados a partir da incubação prévia das células de Schwann em meio RPMI com glicose marcada em seu carbono 6 com o isótopo ($^{13}\text{C}_6$). A abundância relativa de ^{13}C foi avaliada nos diferentes aminoácidos proteínogênicos (alanina, glicina, serina, aspartato, glutamato, prolina, tirosina, fenilalanina, treonina, valina, isoleucina e leucina). Duas abordagens experimentais foram utilizadas, o primeiro consistiu em manter as células de Schwann em meio marcado ($^{13}\text{C}_6$) por três passagens antes da infecção pelo *M. leprae*. No entanto, conforme observado na figura 28, a incubação prévia das células de Schwann com meio marcado resultou no perfil baixo de incorporação de ^{13}C nos aminoácidos.



28. Panorama da incorporação de ^{13}C nos aminoácidos de células pré-incubadas com glicose $^{13}\text{C}_6$. Os aminoácidos foram avaliados em células de Schwann controle (barra listrada), célula de Schwann infectada pelo *M. leprae* (barra preta) e do *M. leprae* intracelular purificado a partir das células de Schwann (barra azul). Foi utilizado nos experimentos meio RPMI sem glicose para a suplementação com glicose $^{13}\text{C}_6$. O tempo de infecção do *M. leprae* nas células de Schwann foi de 48 horas, com a MOI 100:1. Os aminoácidos essenciais para mamíferos são destacados no gráfico (Fenilalanina, treonina, valina, isoleucina e leucina). O gráfico representa a média de incorporação de ^{13}C de um experimento feito em duplicata, no qual 1% de enriquecimento referente a abundância natural do isótopo foi eliminado.

Na segunda abordagem, o meio marcado foi adicionado após 48 horas de infecção do *M. leprae* (figura 29) e foram obtidos perfis mais robustos da incorporação de ^{13}C nos aminoácidos celulares, assim, optamos por utilizar essa abordagem para as outras análises. Uma das preocupações da técnica foi a separação das frações celulares e bacterianas. Contudo, conforme observado na figura 29, o enriquecimento do carbono marcado em células infectadas e do *M. leprae* purificado a partir delas foi substancialmente diferente. Outro aspecto importante: assim como visto na figura anterior, não houve marcação de ^{13}C em aminoácidos essenciais nas células de Schwann infectadas, demonstrando o sucesso na separação dos extratos celulares. Os aminoácidos essenciais não são sintetizados por células de mamíferos, nesse caso, por células de Schwann.

Além disso, também foi avaliado o *M. leprae* mantido em meio axênico (barra verde), para avaliar o enriquecimento de ^{13}C sem a célula de Schwann. Conforme já esperado, o *M. leprae* mantido em meio RPMI marcado não apresentou nenhum enriquecimento de ^{13}C . Ressalta-se que o *M. leprae* não é cultivável *in vitro*, o que pode explicar a ausência de biossíntese de aminoácidos quando mantido na ausência da célula hospedeira.

Cinco aminoácidos observados no *M. leprae* intracelular (alanina, glicina, serina, aspartato/asparagina e glutamato/glutamina) apresentaram cerca de 10% ou mais de enriquecimento de ^{13}C , o que indica que o bacilo teve acesso à glicose marcada (figura 29). Assim, o resultado sugere que o bacilo teve acesso a glicose ou outro metabólito da via glicolítica, como por exemplo, piruvato, de sua célula hospedeira.

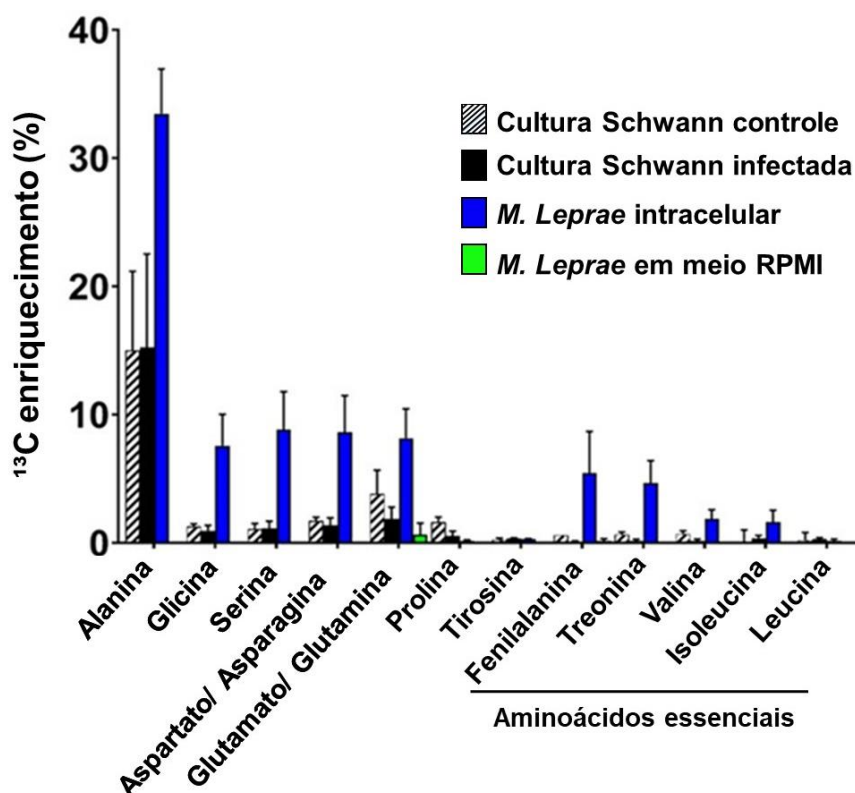


Figura 29. Panorama da incorporação de ^{13}C nos aminoácidos proteínogênicos. Foi analisada a incorporação de ^{13}C em 12 aminoácidos, obtidos a partir de células de Schwann controle (barra listrada), célula de Schwann infectada com *M. leprae* (barra preta), *M. leprae* intracelular purificado a partir das células infectadas (barra azul) e *M. leprae* mantido em meio axênico (barra verde). Após 48 horas de infecção pelo *M. leprae* (MOI 100:1), o sobrenadante foi retirado e foi adicionado meio com glicose ^{13}C , permanecendo por mais 72 horas. A barra representa o desvio padrão do enriquecimento em ^{13}C de 3 experimentos independentes, nos quais foram desconsiderados o enriquecimento abaixo de 1%, referente a abundância natural do isótopo.

Para avaliar se o *M. leprae* importa os aminoácidos da célula de Schwann ou os biossintetiza, a seguir foi avaliada a quantidade de carbonos marcados por aminoácido (figura 30). Nesse caso, somente aminoácidos com sinal de ^{13}C entre as células de Schwann infectadas e o *M. leprae* purificado a partir dessas culturas foram analisados. Prolina e tirosina não foram adicionadas na análise pois tiveram enriquecimento de ^{13}C abaixo de 1%. Na figura 30, a abundância de carbonos marcados com ^{13}C é indicada pelo número de carbonos marcados por aminoácido. A alanina na célula de Schwann infectada, por exemplo, apresentou o percentual elevado de moléculas com todos os três carbonos marcados (M+3), semelhante ao observado no *M. leprae* intracelular. Esse perfil semelhante sugere que o patógeno possa ter incorporado diretamente esses aminoácidos da célula hospedeira.

Semelhante ao observado em alanina, glicina também apresentou a mesma distribuição de ^{13}C (figura 30).

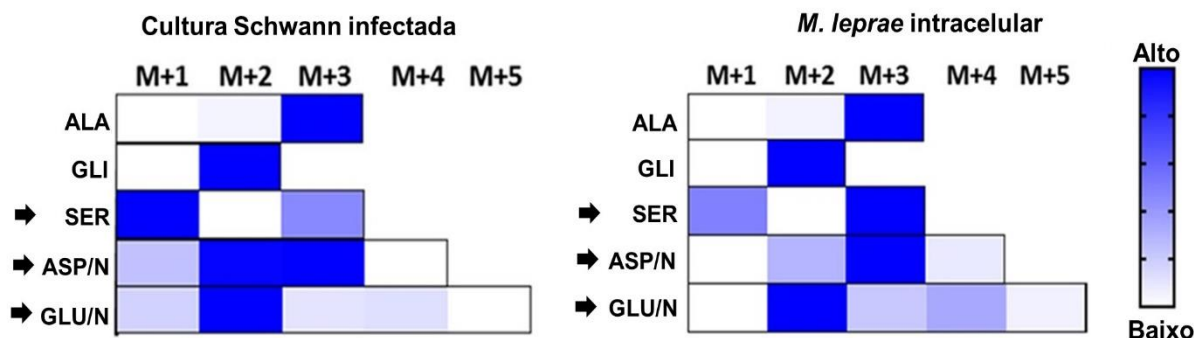


Figura 30. Comparação do perfil de isotopômeros nos aminoácidos. Diferenças entre a abundância de ^{13}C nos aminoácidos não essenciais de células de Schwann infectadas e do *M. leprae* purificado das culturas infectadas, representados pelo mapa de intensidade, onde a classificação “alta” indica muitos carbonos marcados e “baixa” poucos. M+1, M+2, M+3, M+4 e M+5 são as famílias de isotopômeros que apresentaram 1, 2, 3, 4 ou 5 ^{13}C em suas estruturas. As medições representam as médias de três experimentos independentes feitos em duplicata experimental. Os aminoácidos sinalizados apresentaram diferenças entre a célula de Schwann infectada e o *M. leprae* intracelular.

Três aminoácidos apresentam diferenças significativas entre a célula de Schwann infectada e o *M. leprae* intracelular: serina, aspartato e glutamato, indicando que estes são biossintetizados pelo bacilo (figura 30). Com relação a incorporação de ^{13}C em aminoácidos sintetizados a partir de precursores da via das pentoses fosfato, o *M. leprae* intracelular apresentou enriquecimento em fenilalanina (figura 29).

A fenilalanina é um aminoácido aromático sintetizado a partir do corismato, composto gerado pela via do shikimato presente em organismos procariotos (Noda et al., 2017). Outro aminoácido derivado da via do corismato é o triptofano, no entanto, no nosso modelo este não avaliado, pois na etapa da hidrólise ácida é perdido (CHRISTENSEN et al., 1999). Os esqueletos carbônicos que dão origem ao corismato constituem da eritose-4 fosfato da via das pentoses e fosfoenolpiruvato, intermediário da glicólise. Apesar do desvio entre as medições, o dado indica o grande fluxo de carbono para a via das pentoses, uma vez que a fenilalanina apresentou em sua maioria 6 carbonos marcados com o isótopo (figura 31).

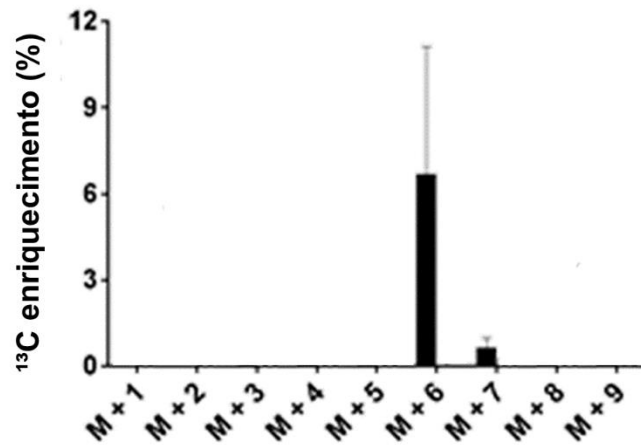


Figura 31. Perfil de isotopômeros ¹³C no aminoácido fenilalanina no *M. leprae* intracelular. M+1, M+2, M+3, M+4, M+5, M+6, M+7, M+8 e M+9 representam as famílias de isotopômeros que apresentaram 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ou 9 ¹³C em suas estruturas, respectivamente. O resultado é expresso em desvio padrão do enriquecimento em ¹³C de três experimentos feitos de forma independente.

5.2 Análise do impacto das alterações do metabolismo glicolítico de células de Schwann sobre neurônios

Foi utilizado o cultivo de neurônios de linhagem como modelo experimental para mimetizar *in vitro* o contato das células de Schwann com o axônio no nervo. Para o ensaio, neurônios de linhagem receberam o sobrenadante da cultura de células de Schwann, mantendo a concentração de 10% do sobrenadante adicionado em relação ao volume total do meio de cultura dos neurônios. Conforme observado na figura 32, a viabilidade dos neurônios é reduzida cerca de 25 % após 24 horas da adição do sobrenadante infectado pelo *M. leprae*.

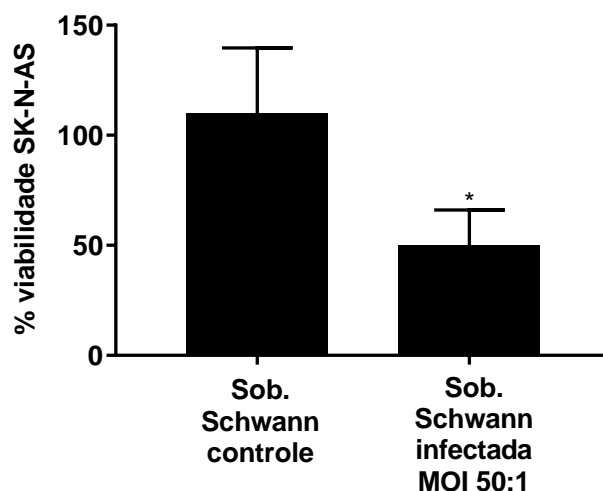


Figura 32. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS suplementados com sobrenadante de células de Schwann. Os valores de densitometria ótica (D.O) obtidos em cada condição foram normalizados utilizando-se como controle de morte celular os neurônios tratados com 15% de DMSO e como controle positivo, os que receberam o sobrenadante de células de Schwann controle. A viabilidade foi analisada por MTT 24 após a adição do sobrenadante de células de Schwann nos neurônios. O gráfico é expresso em desvio padrão dos percentuais de viabilidade da média de três experimentos independentes. A análise estatística por feita por teste t * p 0.0121.

A seguir, buscamos avaliar o impacto da diminuição dos níveis de lactato no sobrenadante das células de Schwann infectadas na viabilidade neuronal. Para isso, primeiro verificamos concentração de lactato nos sobrenadantes utilizados. Além desses dois grupos (Schwann controle e infectada), analisamos o sobrenadante de células de Schwann tratadas com o fármaco 6ANAM, o inibidor específico da glicose 6-fosfato desidrogenase, principal enzima da via das pentoses fosfato. O objetivo da utilização do inibidor foi restaurar os níveis de lactato no sobrenadante, uma vez que esse perfil foi demonstrado por nosso grupo (Medeiros et al, 2016). O 6ANAM foi diluído em DMSO, no entanto, a presença de 1% do veículo em relação ao volume do meio de cultura não alterou a concentração de lactato das células (figura 33).

Conforme observado na figura 33, a infecção pelo *M. leprae* reduz cerca de 60% da concentração de lactato no sobrenadante de células de Schwann, enquanto o tratamento com 6ANAM impede a queda dos níveis de lactato.

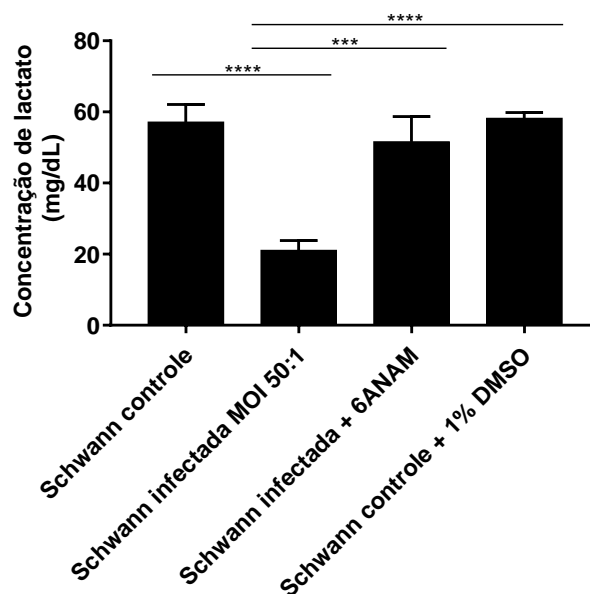


Figura 33. Dosagem de lactato no sobrenadante de células de Schwann. As células de Schwann foram infectadas por 48 horas com a MOI 50:1 de *M. leprae* e, na condição com 6ANAM, foi utilizado 5 μ M do inibidor 24 horas antes da infecção. A solução estoque de 6ANAM foi diluída em DMSO e como controle foi adicionado a condição das células de Schwann tratadas com este veículo. Os níveis de lactato foram analisados através do kit lactato liquiform. O gráfico representa a média de 3 experimentos independentes feitos em triplicata. A análise estatística foi calculada pelo teste ANOVA seguido por Bonferroni, onde **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.0003$ e **** $p < 0.0001$.

Os sobrenadantes acima foram adicionados em neurônios para a aferição da viabilidade pelo teste MTT. Dessa vez, a diferença de viabilidade dos neurônios que receberam o sobrenadante controle e o infectado foi maior, com a queda de aproximadamente 60% da viabilidade. O tratamento com 6ANAM preveniu a morte dos neurônios, conforme observado na figura 34, um efeito que pode ser atribuído ao aumento dos níveis de lactato no sobrenadante das células tratadas com o fármaco.

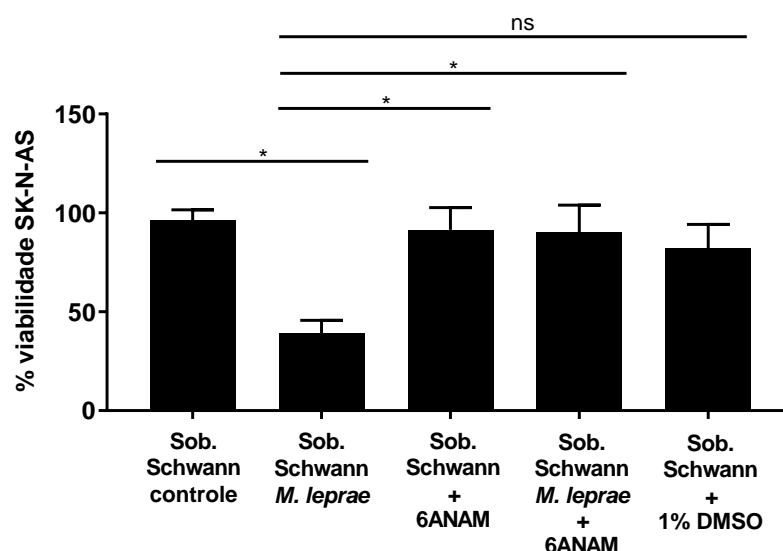


Figura 34. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS suplementados com sobrenadante de células de Schwann tratadas com 6ANAM. Os neurônios foram incubados por 24 horas com o sobrenadante de células de Schwann. A viabilidade foi analisada pelo teste MTT. Os valores de densitometria ótica (D.O) obtidos em cada condição foram normalizados utilizando 15 % de DMSO como controle de morte, enquanto os neurônios que receberam o sobrenadante de células de Schwann controle foram considerados o controle positivo. O gráfico é expresso em desvio padrão dos percentuais de viabilidade da média de dois experimentos independentes. A análise estatística ANOVA seguido de Bonferroni, no qual * $p < 0.0266$, $p < 0.0393$ e $p < 0.0437$.

Devido as células SK-N-AS serem células neuronais tumorais de origem medular, procuramos validar nosso modelo utilizando neurônios primários periféricos. Além disso, a utilização dos neurônios periféricos permite a observação de alterações na morfologia das células, dado não que não foi explorado com as células de linhagem. Da mesma maneira, os neurônios receberam o tratamento com o sobrenadante das células gliais junto ao plaqueamento e após 24 horas os neuritos foram observados. Na figura 35, é possível observar o total de células marcadas com neurofilamento e sua correlação com as células ramificadas. Para essa análise, foram considerados as imagens com 2 ou mais neurônios por campo. O sobrenadante de células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* impactou o perfil geral de ramificação de neurônios primários periféricos, corroborando com o impacto observado em neurônios de linhagem. O tratamento com 6ANAM foi capaz de prevenir o impacto na ramificação dos neurônios (figura 35). Também utilizamos a suplementação direta de lactato nos neurônios que receberam o sobrenadante infectado, e o resultado indicou a melhora no perfil de ramificação celular, porém o resultado não obteve estatística.

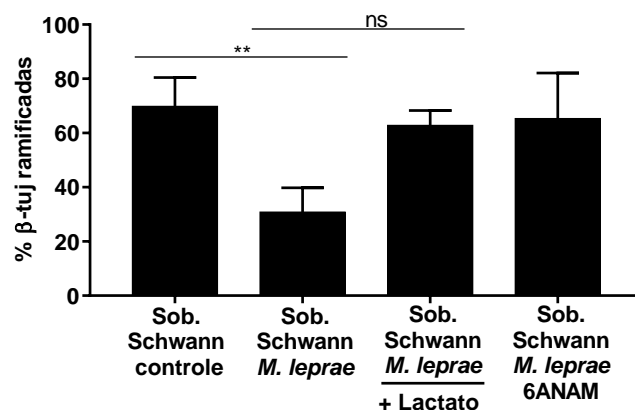
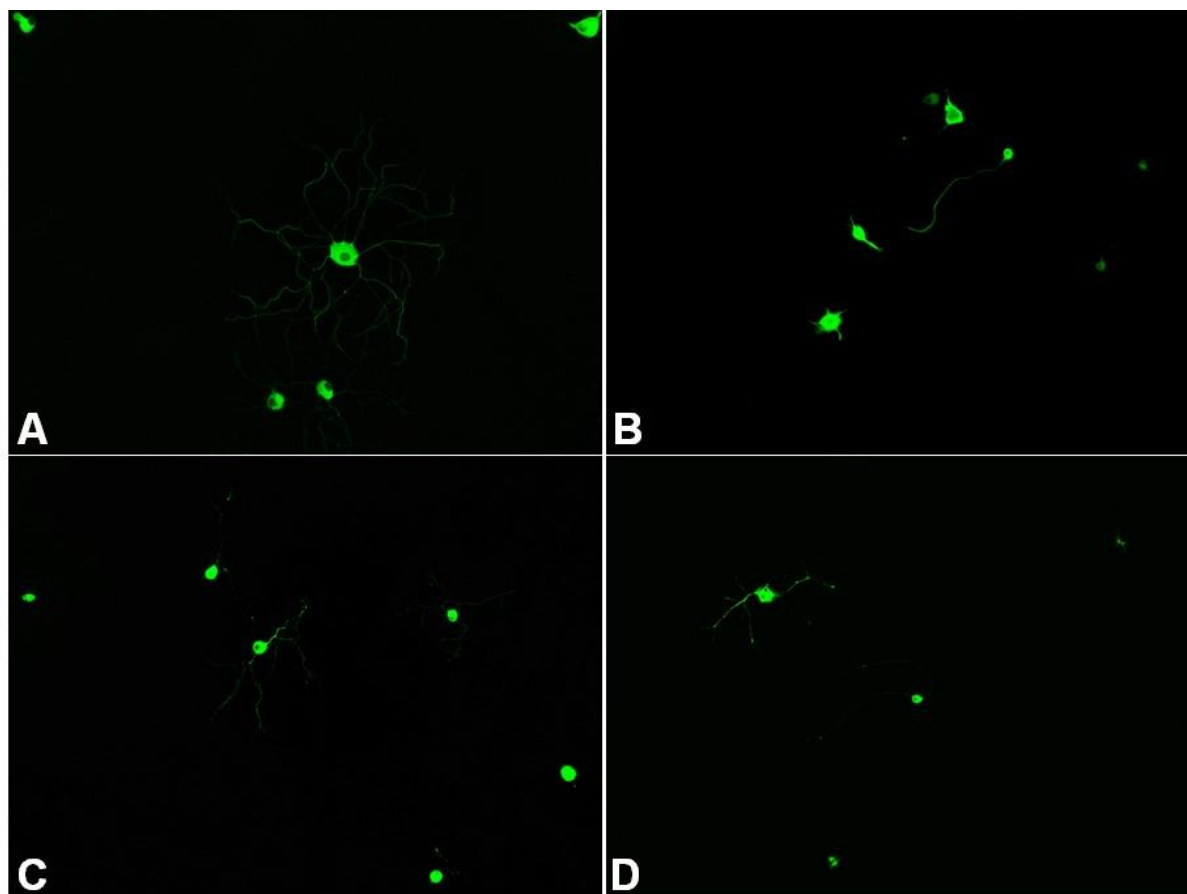


Figura 35. Percentual de células ramificadas marcadas com neurofilamento.

Foram avaliados neurônios individuais que receberam os sobrenadantes de células de Schwann: controle (A), infectado com *M. leprae* (B), infectado tratada com 6ANAM (C) e infectada suplementado com lactato exógeno (D). Quantificação das imagens (E). Para a condição em que os neurônios receberam L-lactato, o sobrenadante das células de Schwann infectadas foi previamente dosado e os neurônios foram suplementados com o déficit de lactato identificado em cada experimento (20-50 mg/dL). O perfil dos neurônios por campo marcados com o anticorpo para neurofilamento β -Tuj1 foi avaliado considerando o total dos neurônios contados por campo 100%. No gráfico é expresso a média e o desvio padrão dos percentuais de neurônios ramificados. A análise estatística foi feita por ANOVA seguido de Bonferroni (** p 0.0028, * p 0.0160).

Em seguida, avaliamos a morfologia de neurônios individuais para obter medidas como comprimento máximo do neurito e complexidade da ramificação, pois a visualização por campo contendo muitos neurônios interfere a análise feita no programa imageJ. Na figura 36, são mostradas imagens de neurônios que receberam o sobrenadante de células de Schwann controle (A), infectadas com *M. leprae* (B), infectadas com *M. leprae* com a inibição prévia da via das pentoses fosfato (6ANAM) (C) e infectadas com *M. leprae* e suplementadas com lactato (D). Ressalta-se que não obtivemos o número satisfatório de neurônios analisados na condição com 6ANAM e, para melhorar a análise, mais neurônios individuais precisam ser observados

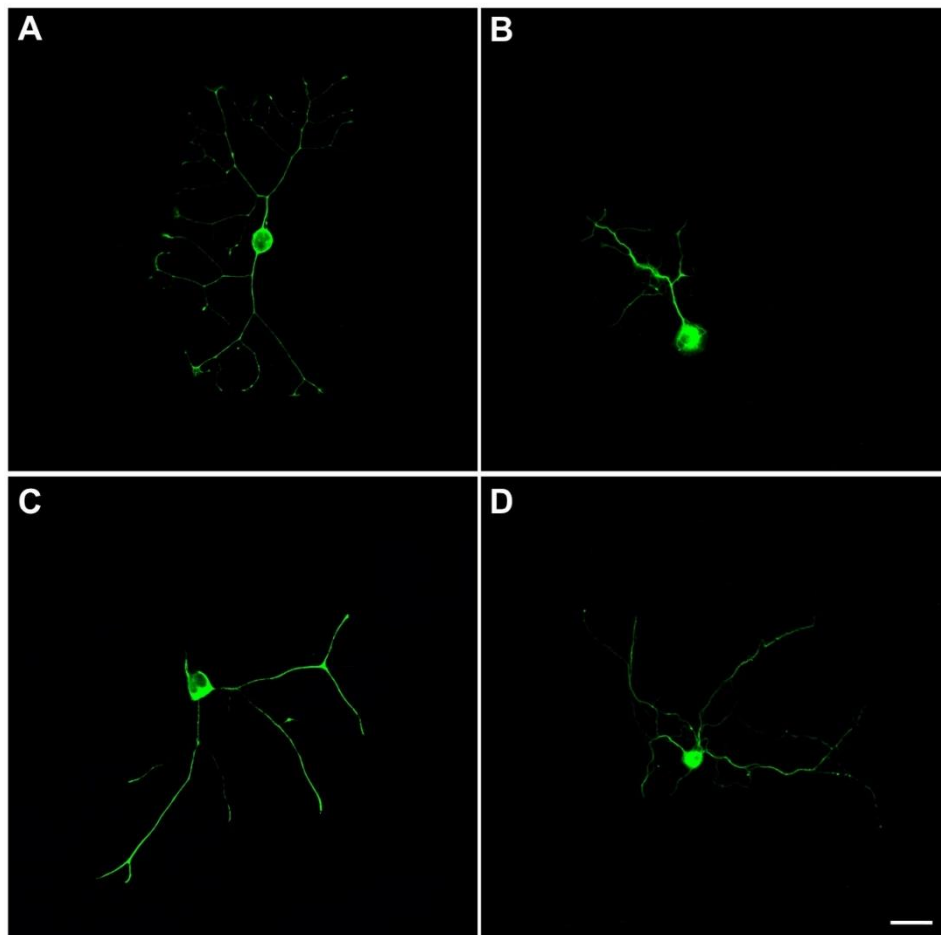


Figura 36. Neurônios primários suplementados com sobrenadante de células de Schwann. Foram avaliados neurônios individuais que receberam os sobrenadantes de células de Schwann: controle (A), infectado com *M. leprae* (B), infectado tratado com 6ANAM (C) e infectado suplementado com lactato exógeno (D). Os neurônios foram marcados com β -Tuj1 (verde). Os neurônios que receberam sobrenadante controle (67 neurônios) e infectado (72 neurônios) representam 5 experimentos diferentes, os que receberam lactato (27 neurônios) representam 3 experimentos e 6ANAM (20 neurônios). Barra de escala: 50 μ m.

A quantificação das imagens é observada na figura 37, onde é possível observar em (A), a complexidade das ramificações dos neuritos e em (B), o comprimento

máximo atingido por estes. Observa-se que o sobrenadante infectado apresenta neurotoxicidade ao neurônio primário, impedindo o seu crescimento em 24 horas. O impacto mais severo na morfologia dos neurônios foi observado na complexidade das ramificações.

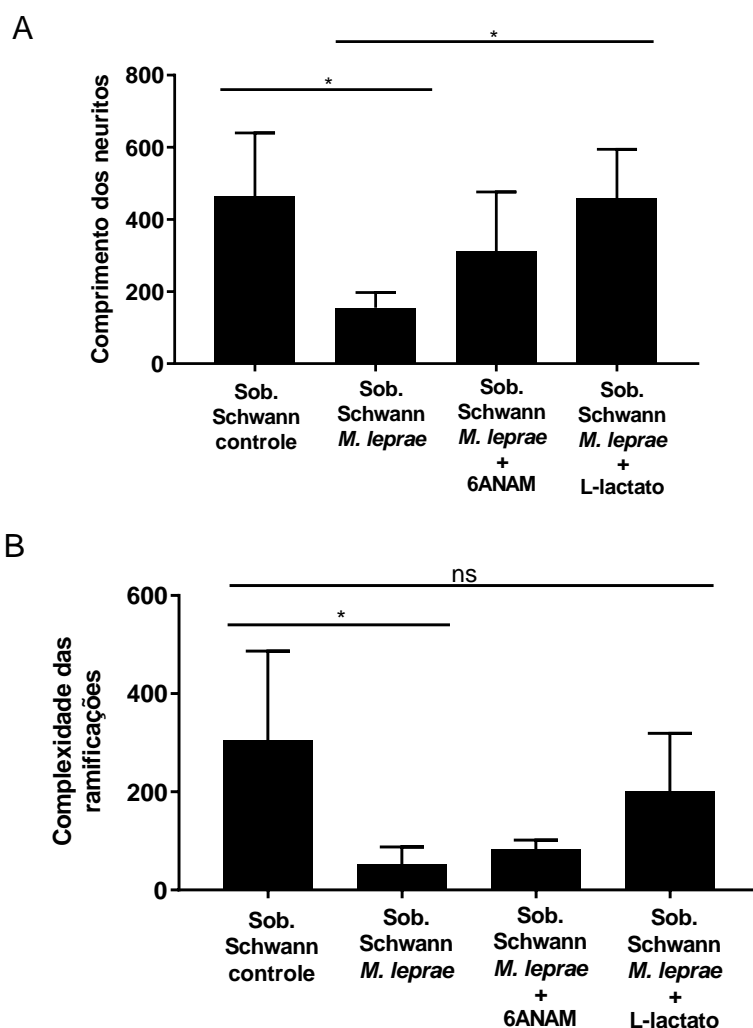


Figura 37. Perfil da morfologia de neurônios primários suplementados com sobrenadante de células de Schwann. Comprimento máximo atingido pelos neuritos (A) e complexidade das ramificações (B). Cada ponto nos gráficos A e B representa um neurônio avaliado. Os gráficos representam a média de 5 experimentos independentes para os neurônios que receberam o sobrenadante controle e infectado e, três experimentos independentes para os que receberam o sobrenadante infectado suplementado com lactato ou 6ANAM. A análise estatística foi feita pelo teste Kruskal-Wallis seguido Dunn's, onde em (A) * p 0.0223, * p 0.0494 e (B) * p 0.0312.

Para investigar se o uso de concentrações maiores de lactato na suplementação de neurônios é benéfico e impede a diminuição da viabilidade, voltamos a análise utilizando neurônios de linhagem. Concentrações baixas como 20 mg/dL já foram

capazes de prevenir a diminuição da viabilidade dos neurônios da linhagem SK-N-AS (figura 38).

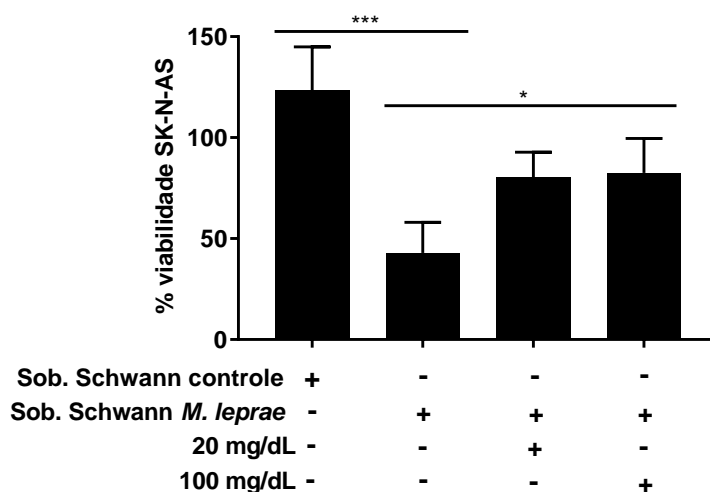


Figura 38. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS suplementados com l-lactato. A viabilidade dos neurônios foi avaliada por MTT, a partir da incubação de 24 horas das células com o sobrenadante de células de Schwann controle e infectadas. Todos os neurônios que receberam lactato exógeno (20, 50 e 100 mg/dL), também receberam o sobrenadante infectado pelo *M. leprae*. O gráfico representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes em quadruplicata. A análise estatística utilizada foi ANOVA seguido de Bonferroni, *** p 0.0004 e * p 0.0301.

Dessa forma identificamos que a queda na liberação de lactato, acarretado pela remodelação do metabolismo central da célula de Schwann infectada pelo bacilo, pode representar um insulto primário na neuropatia hansênica.

5.3 Investigação do desvio de lactato nas células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*.

O próximo passo do nosso estudo foi identificar o destino dos carbonos que não estão mais sendo liberados pelas células de Schwann infectadas na forma de lactato. Para a investigação desta hipótese, as células de Schwann foram incubadas com lactato marcado com ^{14}C e foi analisado o conteúdo lipídico das células. A análise dos lipídios foi feita em foldchange, em relação a marcação de ^{14}C em células de Schwann controles para cada lipídio analisado. Conforme observado na figura 39, a abundância de ^{14}C nos fosfolipídios das células de Schwann infectadas foi cerca de 2,4 vezes

maior do que o controle sem o bacilo e, 1,4 vezes maior para o triacilglicerol. A linha pontilhada indica o basal de incorporação do isótopo nas células controles.

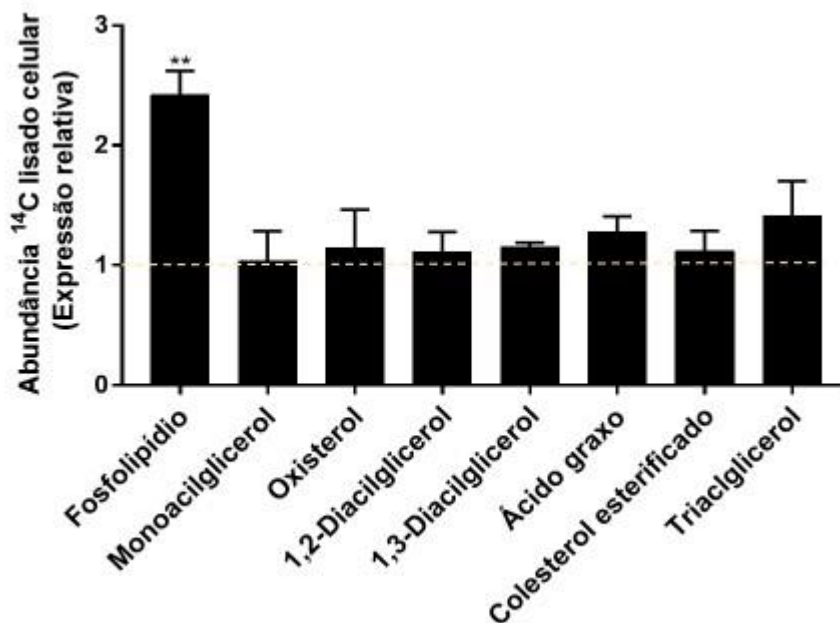


Figura 39. Análise da abundância de ¹⁴C em lipídios intracelulares em células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*. Após 48 horas de infecção com *M. leprae*, o meio de cultura foi trocado e as células foram incubadas com 5µcurrie de L-lactato ¹⁴C por mais 72 horas. O mesmo procedimento foi feito para as células controles, exceto a etapa de adição do bacilo. O método Bligh & Dyer foi utilizado para a extração lipídica e posterior passagem pela TLC e cintilografia líquida. O cálculo da expressão relativa foi realizado em relação a abundância de ¹⁴C das culturas controle para cada lipídio. A análise estatística foi feita pelo teste t ** $p < 0.0097$.

Para validar os dados obtidos com o carbono radioativo, células de Schwann foram incubadas com lactato e coradas com BODIPY para a observação de corpúsculos lipídicos (figura 40). A adição de lactato amplificou o efeito observado de acúmulo de lipídios nas células de Schwann infectadas pelo bacilo.

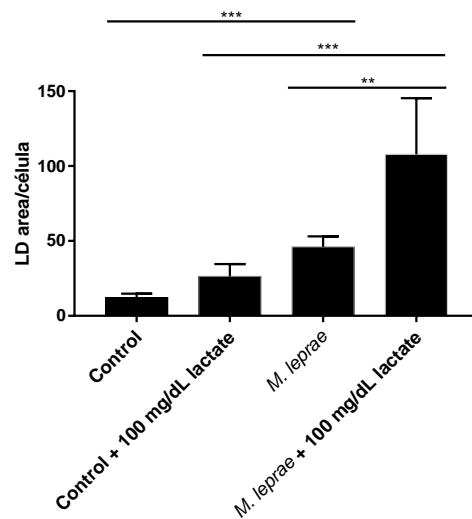
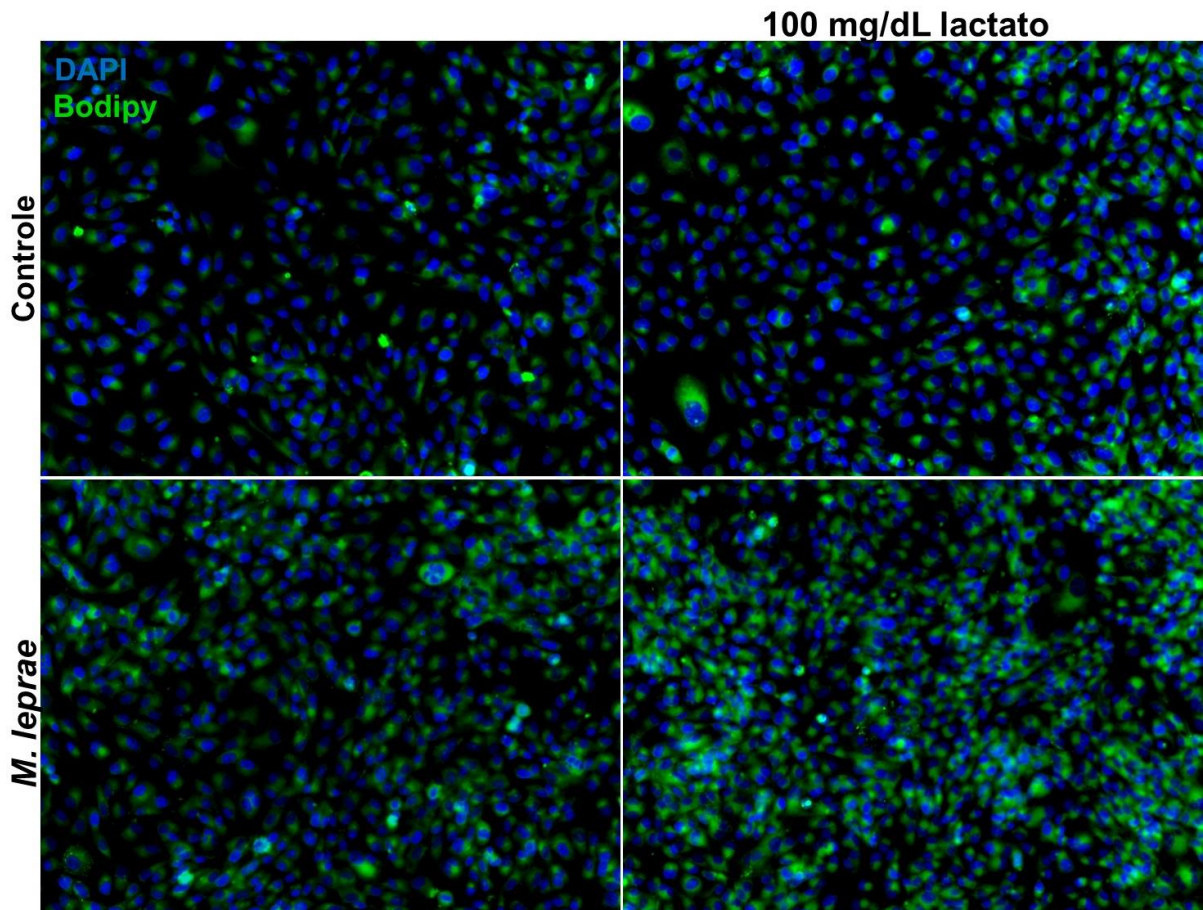


Figura 40. Avaliação do acúmulo lipídico em células de Schwann controles e infectadas pelo *M. leprae* após a adição de lactato. O acúmulo lipídico foi avaliado após 72 horas de infecção pelo *M. leprae* (MOI 50:1). 100 mg/dL de lactato foi suplementado nas células controle e infectadas e o conteúdo lipídico avaliado pela incubação com bodipy 493/503. A quantificação da fluorescência foi feita através no cytell, onde foi considerado o total de células por campo coradas com DAPI e a intensidade do sinal de bodipy. O gráfico representa a média e desvio padrão de dois experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi calculada por ANOVA seguida de Bonferroni *** p 0.0004, ** p 0.0042 e *** p 0.0007.

A seguir, observamos a incorporação de lactato ^{14}C nos lipídios extraídos do sobrenadante de células de Schwann. À exceção do colesterol esterificado, todos os outros lipídios avaliados apresentaram aumento na abundância de ^{14}C em relação ao observado na célula controle (figura 41).

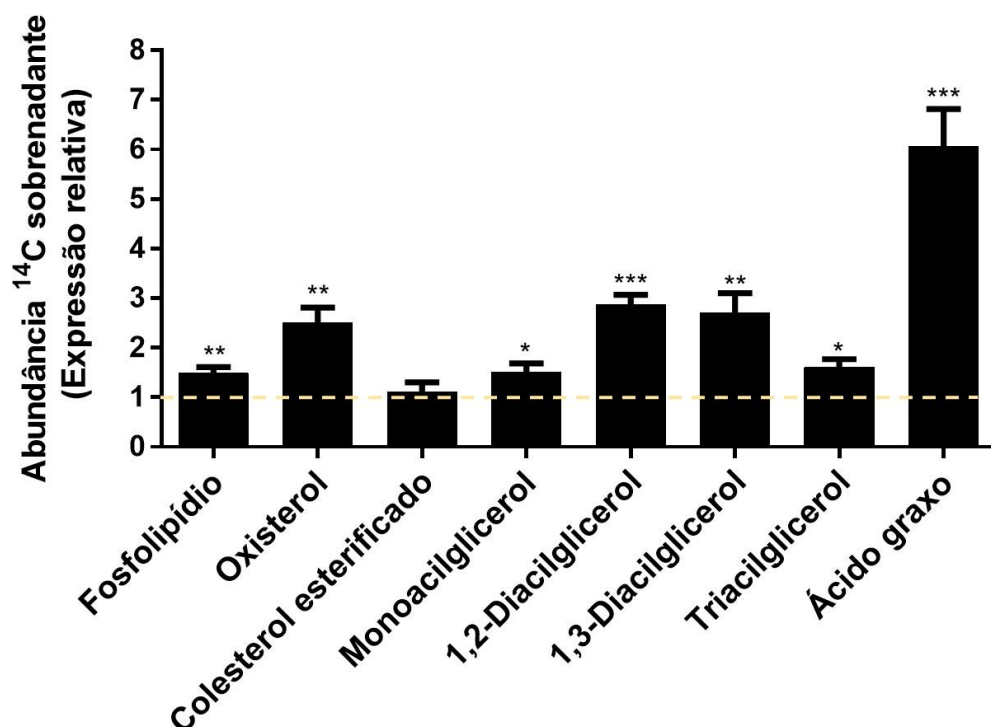


Figura 41. Análise da abundância de ^{14}C em lipídios do sobrenadante de células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*. As células foram incubadas com ^{14}C lactato e a avaliação foi feita de acordo com o descrito na figura anterior, utilizando-se nesse caso o sobrenadante da cultura. O gráfico representa a análise de 4 experimentos independentes. O cálculo do foldchange foi realizado em relação a abundância de ^{14}C em lipídios da célula controle e a linha reta pontilhada representa o valor basal. A análise estatística foi feita por teste t, * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

5.4 Avaliação da toxicidade de lipídios presentes no sobrenadante de células de Schwann

O aumento de lipídios marcados com ^{14}C no sobrenadante celular (figura 41) nos chamou atenção para a investigação de potenciais efeitos neurotóxicos promovidos por estes no nosso modelo. Desse modo, foi feita a extração lipídica do sobrenadante das células de Schwann controles e infectadas, através do método Bligh & Dyer (1959). Previamente, as fases orgânica e aquosa da extração foram adicionadas a placa de cultura dos neurônios. Em seguida as células foram adicionadas e a viabilidade verificada após 24 horas (figura 42).

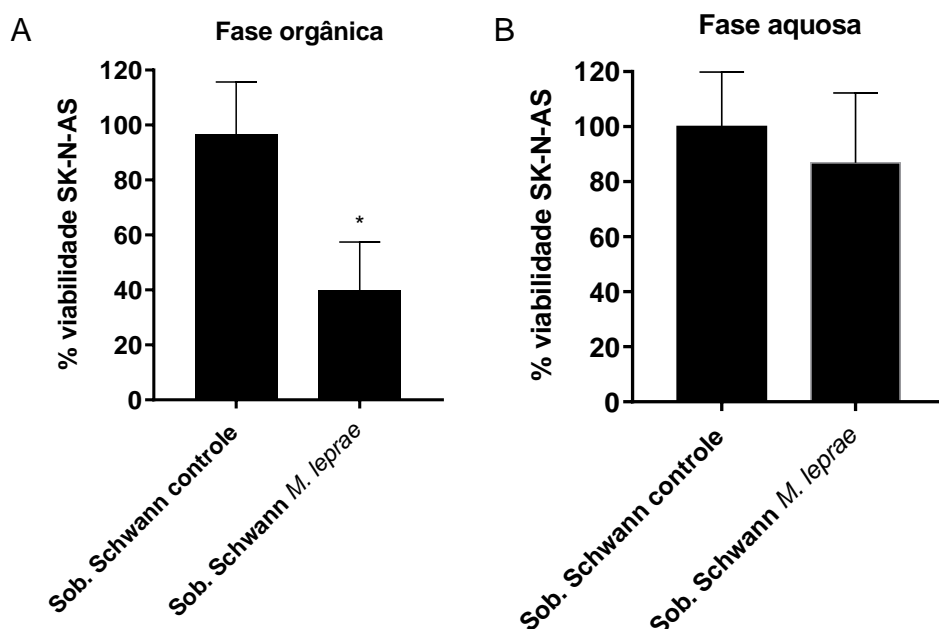


Figura 42. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS suplementados com o produto da extração lipídica do sobrenadante de células de Schwann. (A) Adição em neurônios da fase orgânica da extração do sobrenadante controle e infectado pelo *M. leprae* (MOI 50:1) e em (B) adição da fase aquosa da extração. A viabilidade foi analisada por MTT, após 24 horas de incubação. O gráfico representa a média e o desvio padrão de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi feita por teste t * $p < 0.0101$.

O conteúdo lipídico presente no sobrenadante foi capaz de diminuir cerca de 58% da viabilidade dos neurônios avaliados (figura 42A). O efeito observado na queda da viabilidade foi mais modesto com a adição da fase aquosa, não apresentando diferença significativa (figura 42B). Em busca de mais informações sobre o (s) componente (s) citotóxicos presentes na cultura infectada, fracionamos o sobrenadante de células de Schwann controles e infectadas através do HPLC. Ao total, 70 frações foram coletadas e, posteriormente, adicionadas em cultura de neurônios para a verificação da viabilidade. As frações foram organizadas em grupos de 10, a partir coleta por ordem de saída do equipamento. Assim, avaliamos o conteúdo proteico presente nas amostras agrupadas (figura 43).

Sabe-se que o sobrenadante celular é rico em albumina, uma vez que as células são suplementadas com 10% de soro fetal bovino, porção do sangue abundante da proteína. A partir da adição do padrão de albumina nos géis, os resultados sugerem a abundância da proteína nos grupos 31-40 e 41-50 (~65kDa) (figura 43). Lipídios são moléculas hidrofóbicas e, por isso, não são capazes de atravessar o citoplasma celular ou manter-se livre em fluidos extracelulares. Nesse contexto, a albumina é a principal proteína que se liga aos ácidos graxos presentes no soro. Apesar disso, não podemos afirmar o envolvimento da albumina a partir dos nossos resultados, uma vez que não foram feitos experimentos para a marcação específica da proteína.

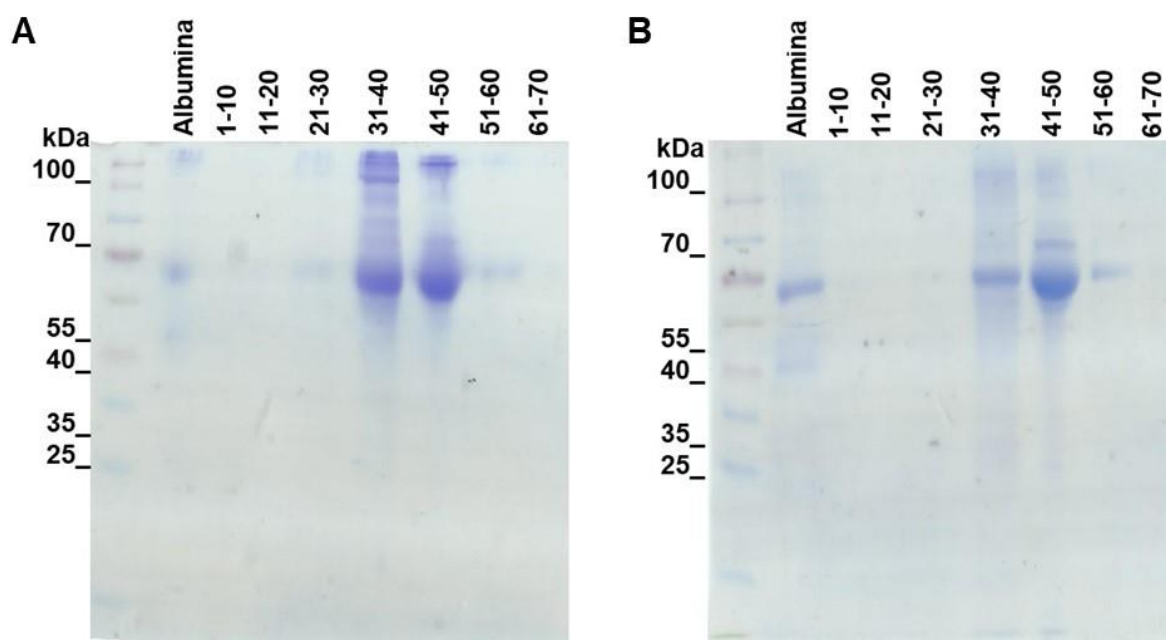


Figura 43. Perfil proteico do sobrenadante fracionado. (A) fracionamento do sobrenadante de células de Schwann controle e (B) células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*. Parte das frações coletada do HPLC foi organizada em grupos contendo 10 frações de acordo com a ordem de saída do aparelho. Foram adicionados 10 µg dos grupos 1-10; 11-20; 21-30; 31-40; 41-50; 51-60 e 61-70 e, além disso, foi adicionado 2µg de albumina ao gel. Coomassie foi utilizado como corante após a eletroforese.

Com a finalidade de investigar o perfil neurotóxico das frações, neurônios periféricos e de linhagem foram tratados com as frações (figura 44 e 45).

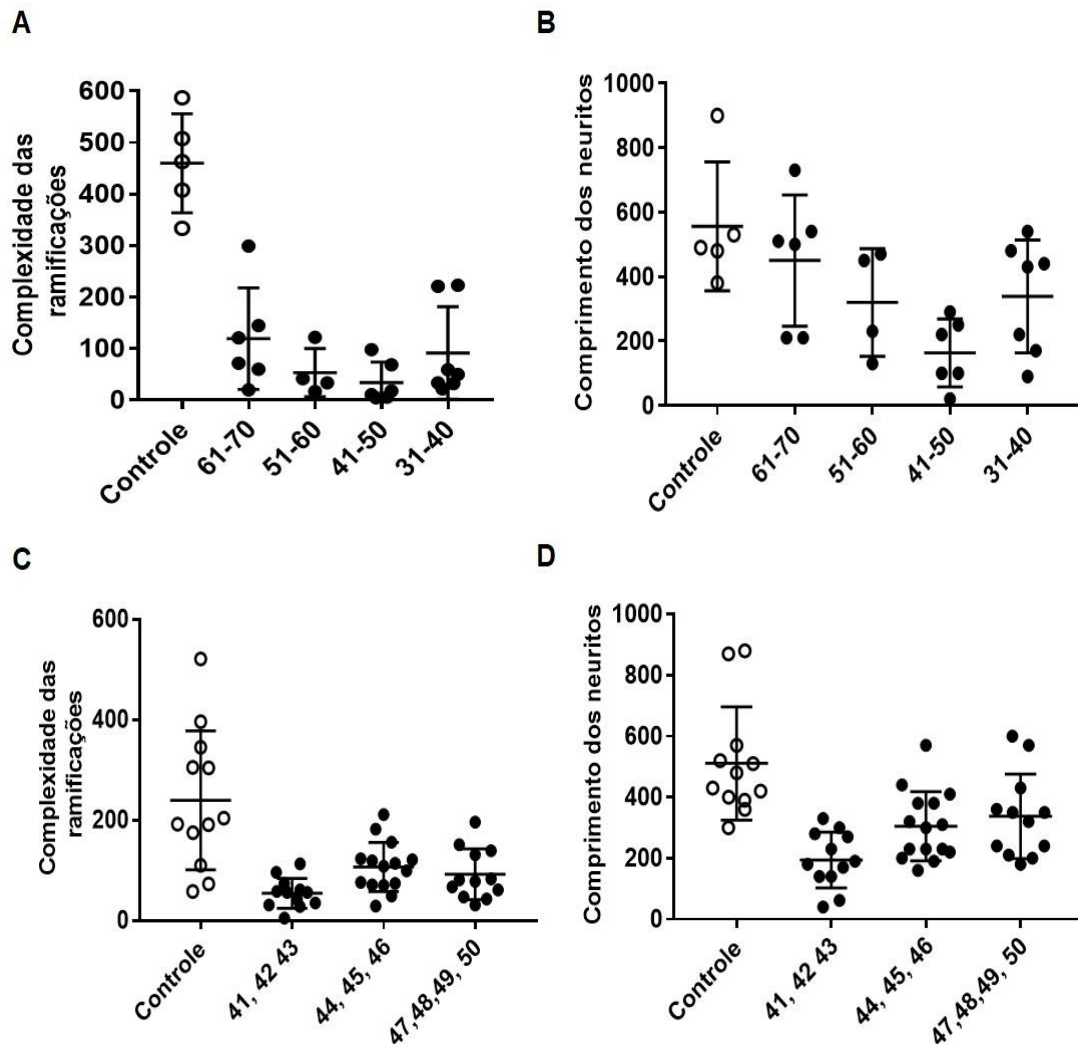


Figura 44. Perfil da morfologia de neurônios primários suplementados com as frações geradas a partir do sobrenadante de células de Schwann infectado. A e D representam a complexidade e o comprimento máximo atingido pelos neuritos, respectivamente, de neurônios tratados com as frações organizadas em 10 por grupo (61-70; 51-60; 41-50; 31-40). C e D, neurônios primários que receberam os grupos 41-43, 44-46 e 47-50. O controle de cada gráfico é referente aos neurônios que não receberam nenhum estímulo, somente o fator de crescimento neuronal (NGF). Os gráficos expressam a média e desvio padrão de um experimento, onde foram utilizados “pools” de gânglios de 4 camundongos neonatos para a obtenção de neurônios individuais.

O grupo com as frações 41-43 apresentou maior impacto na ramificação e no comprimento máximo atingido pelos neuritos dos neurônios (figura 44). Destaca-se que poucos neurônios foram avaliados nos ensaios acima, assim, utilizamos o modelo com neurônios de linhagem para a análise de mais células.

Novamente, o perfil observado nos neurônios primários se manteve com a utilização dos neurônios de linhagem (figura 45). Além disso, avaliamos a

neurotoxicidade das frações individuais 41, 42 e 43, mais prejudiciais em nosso modelo (figura 45, C).

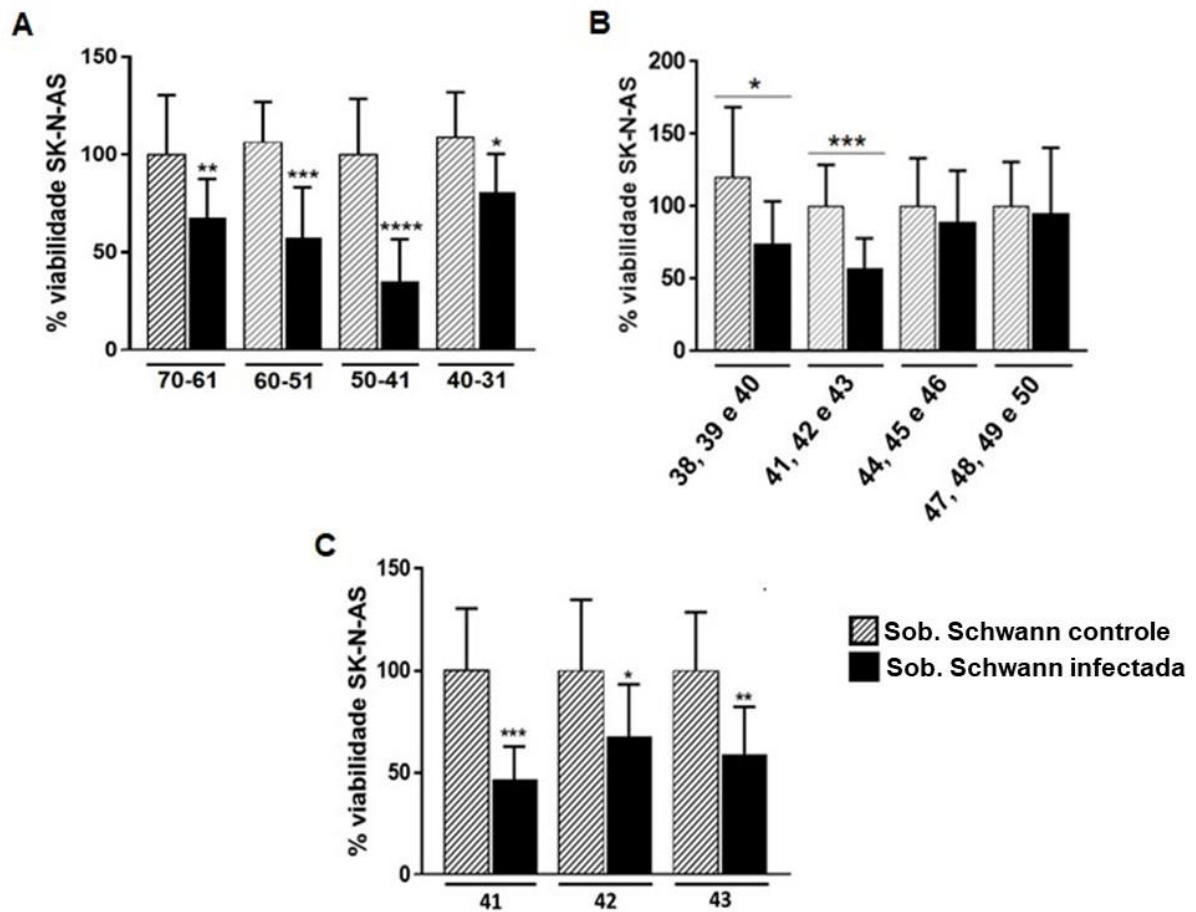
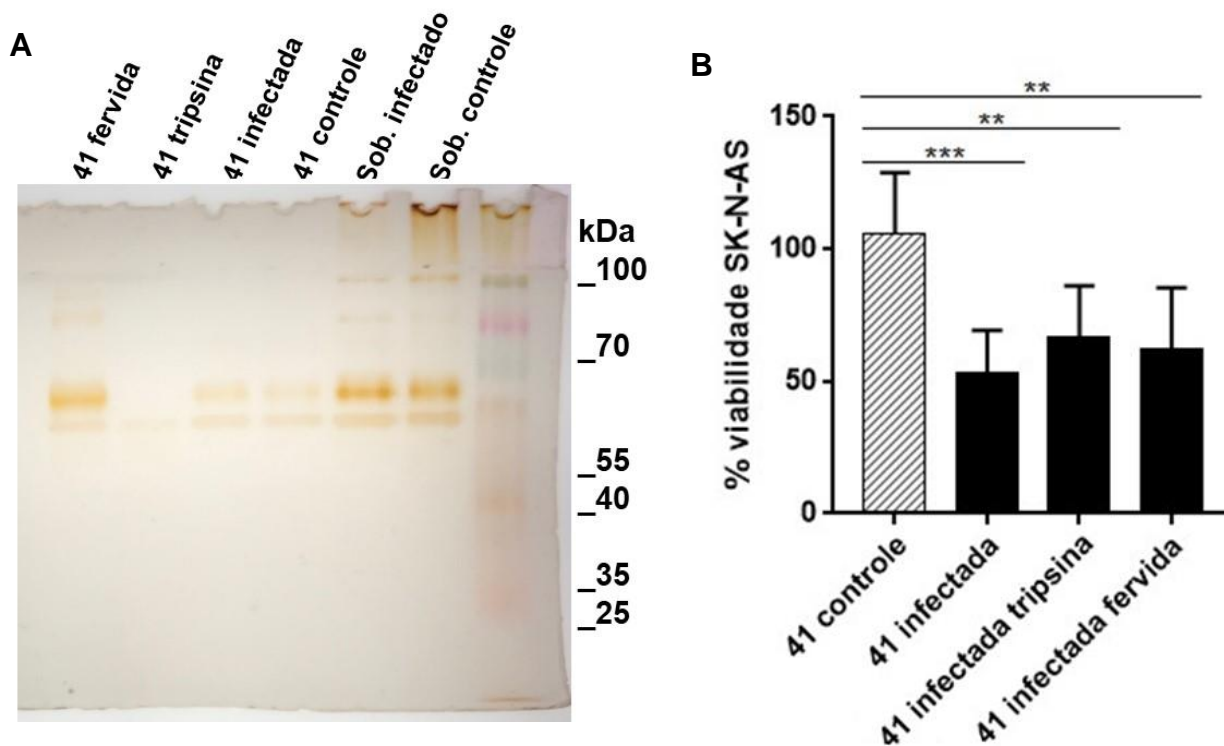


Figura 45. Viabilidade de neurônios da linhagem SK-N-AS após a adição do sobrenadante fracionado. Em (A), neurônios que receberam as frações 70-61, 60-51, 50-41 e 40-31. (B) neurônios após o tratamento com as frações 38-40, 41-43, 44-46 e 47-50. (C) neurônios após o tratamento com as frações individuais 41, 42 e 43. Os gráficos expressam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes em quadruplicata. O cálculo estatístico foi feito entre os neurônios que receberam fração controle (barra listrada) e infectada (barra preta), feito por teste t (A, $p^{**}0,0015$; $p^{***}0,0002$; $p^{****}<0,0001$, $p^*0,0133$ / B, $p^*0,0207$, $p^{***}0,0005$ e C, $p^{***}0,0007$; $p^*0,0185$ e $p^{**}0,0015$).

Conforme mostrado na figura 46, a fração 41 parece ser o pico de eluição do (s) fator (es) neurotóxicos. A seguir foram feitos testes como desnaturação por calor ou digestão enzimática com tripsina, a fim de observar a perda do efeito e identificar a natureza química do composto. Mesmo após esses dois métodos de proteólise, não houve perda da atividade da fração, sugerindo que este efeito pode não estar relacionado a proteínas (figura 46).



46. Tratamento da fração 41 e observação de seu efeito citotóxico em neurônios de linhagem. A fração 41 foi tratada com 0.05% de tripsina durante 2 minutos sob temperatura de 37°C ou fervida por 2 minutos. Em A é mostrado o perfil de proteínas após os tratamentos desnaturantes. Em (B), o impacto do tratamento da fração 41 na viabilidade (MTT) de neurônios de linhagem. O gráfico B representa a média e o desvio padrão de três experimentos independentes em triplicata. O cálculo estatístico foi feito por teste t, em relação a fração 41 controle ($p^{***}0.0003$; $p^{**}0,0014$ e $p^{**}0,0012$).

Corroborando com o resultado da diminuição da viabilidade de neurônios tratados com lipídios do sobrenadante de células de Schwann infectadas, a figura 46 também indica moléculas neurotóxicas de natureza lipídica. Tanto as amostras da extração lipídica quanto a fração 41 foram levadas para identificação lipídica por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC-MS), no entanto, houve uma grande variação no perfil de íons encontrados entre as replicatas experimentais analisadas. Assim, optamos por não inferir sobre os dados neste documento.

Foi demonstrado que as células de Schwann fornecem maquinaria para a síntese proteica dos axônios através da liberação de microvesículas que variam de 20 a 120 nm, conhecidas como exossomos (Lopez-Verrili et al., 2012). Além do envio de metabólitos para o suporte como proteínas, DNA, RNA e lipídios, os exossomos também podem transportar moléculas prejudiciais ao axônio (Kalluri & Lebleu., 2020).

Dessa forma testamos em nosso modelo se exossomos liberados pelas células de Schwann poderiam transportar os lipídios presentes no sobrenadante celular. Para isso, foi utilizado o protocolo de ultracentrifugação para a depleção de possíveis exossomos presentes no sobrenadante. Conforme observado na figura 47, não observamos melhoria na viabilidade dos neurônios que receberam o sobrenadante infectado após o protocolo de depleção de exossomos (barra exossomos -, sob.Schwann infectado).

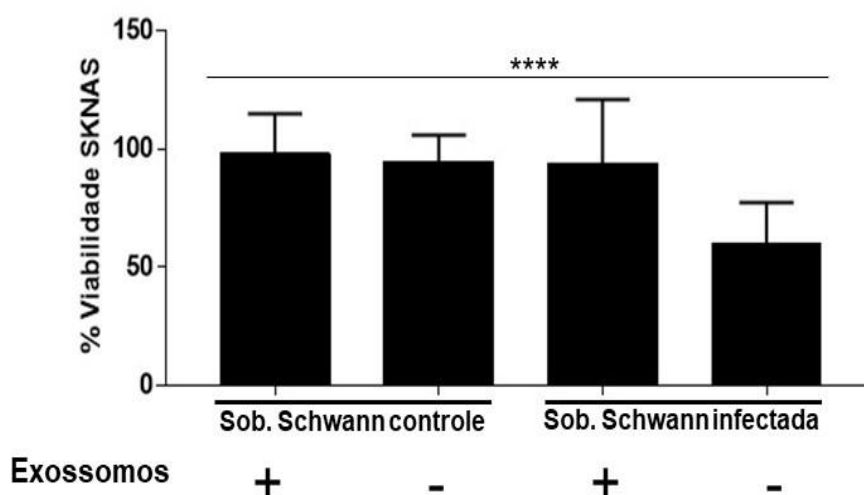
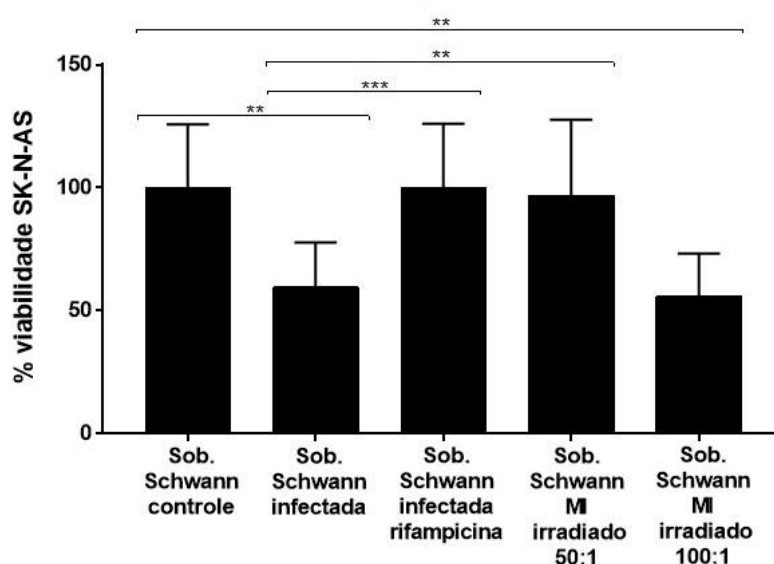


Figura 47. Viabilidade de neurônios de linhagem suplementados com exossomos. Os exossomos foram purificados do sobrenadante da cultura de células de Schwann infectada ou não pelo *M. leprae*. No gráfico as barras com sinal + representam a adição dos exossomos purificado do sobrenadante na cultura de neurônio. Enquanto as barras com sinal – representam a adição do sobrenadante com exossomos depletados. Os valores representados no gráfico de MTT, são a média e o desvio padrão de três experimentos independentes feitos com 6 replicatas biológicas. A análise estatística foi calculada por ANOVA seguido de Bonferroni, p **** 0.0001 é a significância estatística de todas as barras em relação aos neurônios que receberam o sobrenadante infectado com exossomo depletado.

5.5. Análise da capacidade do *M. leprae* morto em gerar o efeito neurotóxico no sobrenadante

A seguir, investigamos se o bacilo morto é capaz de promover a geração dos fatores neurotóxicos no sobrenadante celular. Para os ensaios, as células de Schwann foram incubadas com o bacilo morto por irradiação ou pelo tratamento com rifampicina, fármaco utilizado no tratamento da hanseníase. Foi demonstrado por Lobato e col. (2014) que o tratamento com 10µg/mL de rifampicina diminui a viabilidade do *M. leprae* nas células THP-1, sendo assim, utilizamos a mesma concentração para o ensaio.

Conforme é observado na figura 48, exposição de células de Schwann ao *M. leprae* morto na MOI 50:1 não é suficiente para gerar o fator neurotóxico no sobrenadante. O mesmo perfil foi observado nos neurônios que receberam o sobrenadante estimulado com *M. leprae* morto pela rifampicina, no qual foi utilizada a mesma MOI 50:1. No entanto, a exposição a maiores quantidades de bacilos (MOI 100:1), foi capaz de reduzir cerca de 45% da viabilidade dos neurônios de linhagem avaliados



48. Viabilidade neuronal após o estímulo com sobrenadante de células expostas ao *M. leprae* morto. Neurônios de linhagem foram tratados com o sobrenadante de células de Schwann expostas ao *M. leprae* morto por irradiação (MOI 100:1 e 50:1) ou morto pela administração de rifampicina (MOI 50:1). A viabilidade foi aferida por MTT 24 horas após a adição do sobrenadante. O gráfico representa a média e desvio padrão de dois experimentos independentes em oito replicatas biológicas. O cálculo estatístico foi feito através de ANOVA e bonferroni, p** 0,0022 (sob. Controle x infectado); p*** 0,0005 (sob. Infectado x sob infectado + rifampicina); p ** 0,0022 (sob. Infectado x sob. *M. leprae* irradiado 50:1); p ** 0,033 (sob. Controle x sob. irradiado 100:1).

O PGL-1 é o principal componente presente no *M. leprae* morto associado ao contato bactéria-glia. Assim, buscamos avaliar o impacto no metabolismo glicolítico de células de Schwann estimuladas com este componente do envelope celular do bacilo. Para os ensaios, foi utilizada a cepa de *Mycobacterium bovis* BCG modificada geneticamente para expressar PGL-1 (BCG-PGL-1). Além disso, utilizamos como controle a cepa BCG não recombinante.

Destaca-se que o BCG-PGL1 é internalizado com sucesso na célula hospedeira, enquanto a internalização observada por BCG é irrisória (Acosta et al., 2018). Para a avaliação do impacto de PGL-1 *per se*, utilizamos beads de poliestileno revestidas com este glicolípido e beads vazias como controle.

Conforme exibido da figura 49, a infecção pelo *M. leprae* promove o aumento da captação de glicose pelas células de Schwann. Embora não tenha significância estatística, os resultados indicam a tendência do aumento na captação de glicose nos grupos das células expostas ao PGL-1.

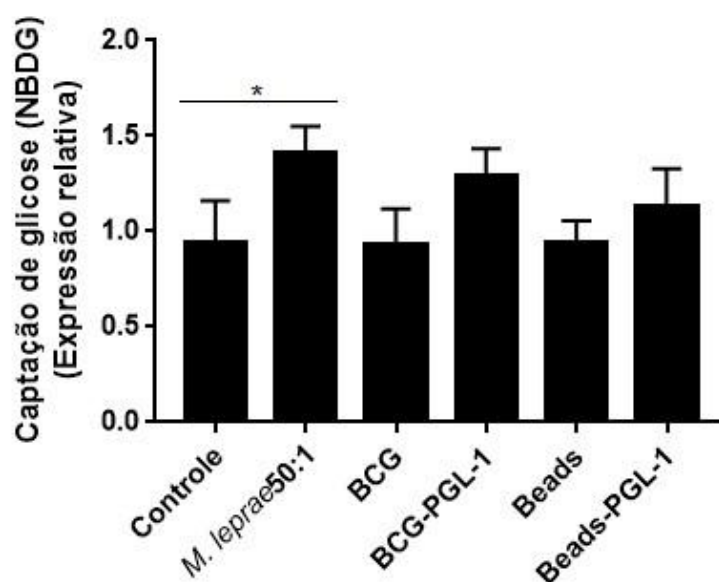


Figura 49. Captação de glicose de células de Schwann expostas ao PGL-1. As células foram incubadas com NBDG após 48 horas de estimulação com BCG, BCG-PGL-1, beads vazia ou beads PGL-1. A MOI 50:1 foi utilizada em todos os grupos. O gráfico representa a análise de 2 experimentos independentes em triplicata biológica. A expressão relativa foi calculada a partir da razão entre média dos valores de intensidade média de fluorescência de NBDG de cada grupo e os valores do grupo controle. A significância estatística foi calculada por ANOVA seguida de Bonferroni ($p < 0,0254$).

Observamos também o potencial elétrico da membrana mitocondrial das células de Schwann, a partir da incubação com a sonda TMRM. Todas as membranas celulares apresentam potencial de membrana, assim, para mensurar somente o mitocondrial, os ensaios foram feitos na presença do desacoplador mitocondrial CCCP. Os resultados foram obtidos a partir da razão entre o sinal de fluorescência de TMRM e o sinal de TMRM da célula pré-incubada com CCCP. O estímulo com BCG-PGL-1 resulta na diminuição significativa do potencial elétrico mitocondrial de células de Schwann, quando comparado com a célula controle ou a estimulada com BCG (figura 51).

A diminuição também foi observada em células estimuladas com beads vazias e, o efeito foi intensificado na presença do PGL-1 (figura 50). Dessa forma, os ensaios sugerem que o PGL-1 per se é suficiente para promover alterações no metabolismo glicolítico das células hospedeiras.

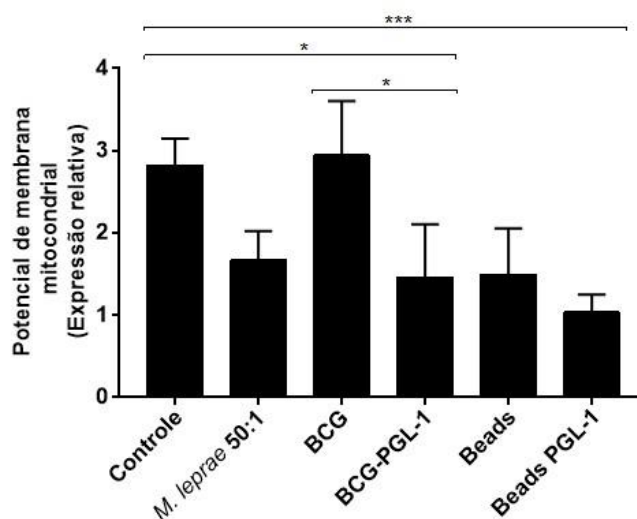
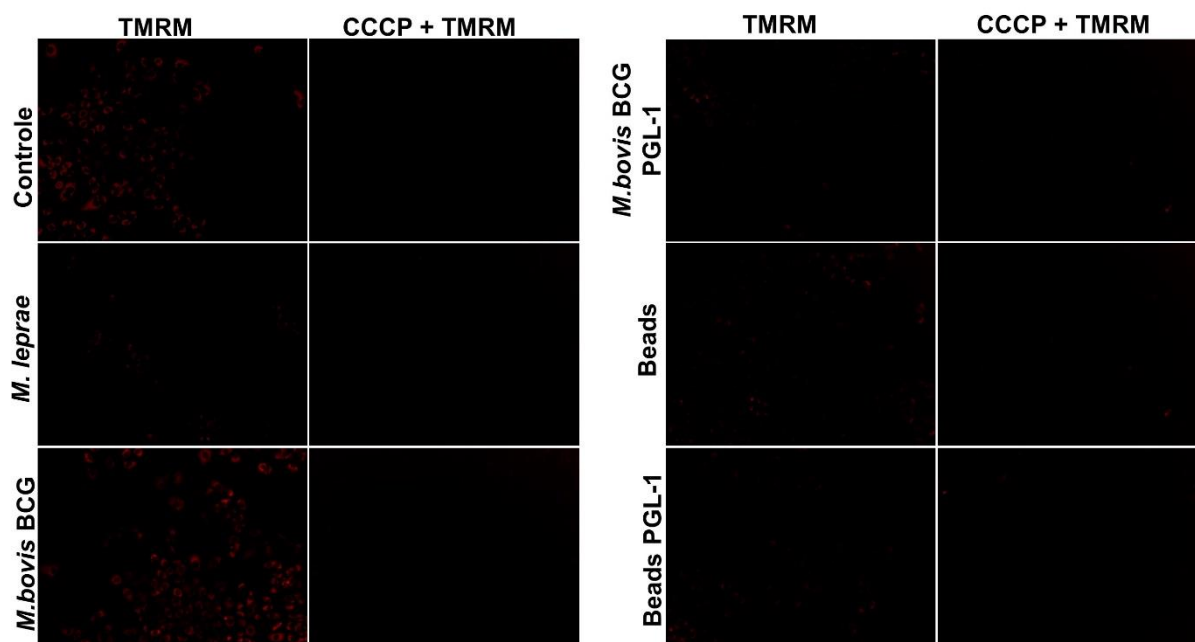


Figura 50. Avaliação do potencial elétrico mitocondrial de células Schwann expostas ao PGL-1. As células foram incubadas por 48 horas com *M. leprae* vivo, BCG, BCG-PGL-1, beads vazias ou beads-PGL-1, utilizando-se a MOI 50:1 para todos os grupos analisados. A intensidade média de fluorescência do TMRM foi obtida a partir da leitura pelo cytell. Para o cálculo da expressão relativa, a média da intensidade de fluorescência (IMF) foi dividida pela IMF do controle de cada grupo incubado com o desacoplador CCCP. O gráfico representa a análise de quatro experimentos independentes em duplicata biológica. O cálculo estatístico foi calculado por ANOVA seguido de Bonferroni ($p^{***}0,0004$; controle x BCG-PGL1 $p^* 0,0220$; BCG x BCG-PGL1 $p^* 0,0105$).

A seguir, foi feita a dosagem da concentração de lactato do ensaio acima. Conforme esperado, o estímulo com *M. leprae* vivo os reduz os níveis de lactato do sobrenadante das células de Schwann. O estímulo com *M. bovis* BCG-PGL1 também foi capaz de

promover a redução de forma significativa (figura 51). Embora a adição de bead-PGL-1 diminua o lactato no sobrenadante, esse efeito também foi observado com as células controles estimuladas com beads vazias.

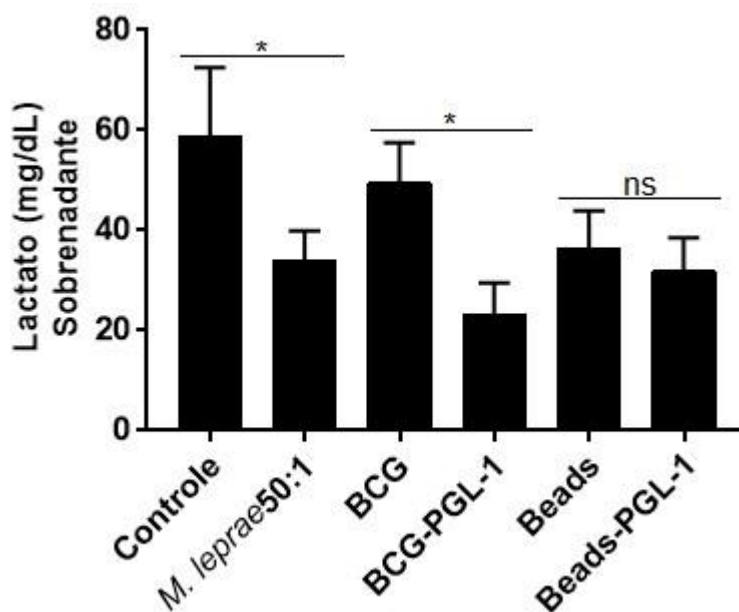
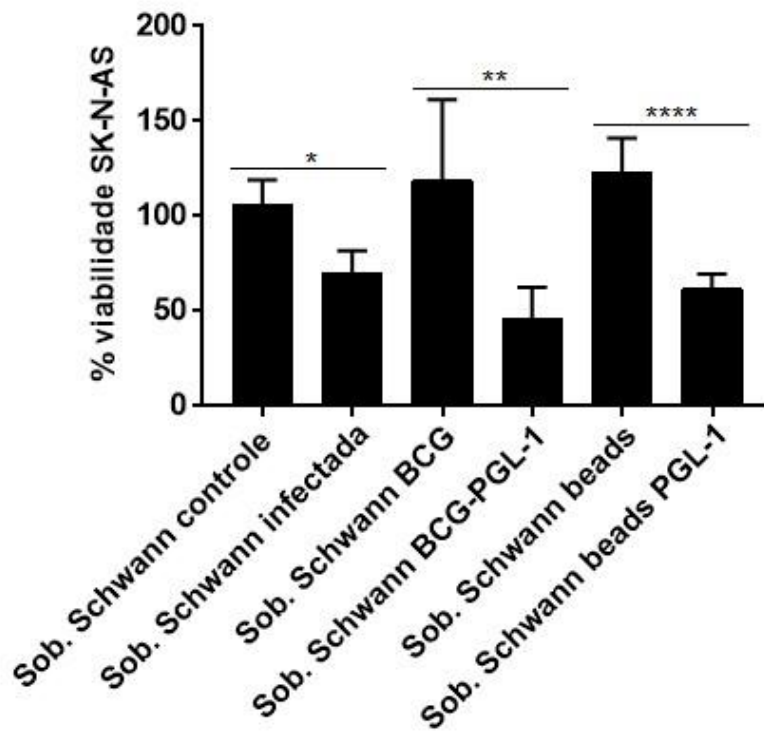


Figura 51. Concentração de lactato no sobrenadante de células de Schwann estimuladas com BCG-PGL1. As células de Schwann foram incubadas com *M. leprae*, beads e BCG por 48 horas com a MOI 50:1. O gráfico expressa a média e desvio padrão da análise de 2 experimentos independentes em triplicata. A significância estatística foi avaliada por ANOVA seguido de Bonferroni ($p^* < 0,019$ e $p^* 0,0114$).

Por fim, os neurônios foram tratados com o sobrenadante das células de Schwann expostas a cepa *M. bovis* BCG recombinante expressando PGL-1, além de beads vazias ou recobertas com o PGL-1, para a avaliação da viabilidade por MTT. Conforme mostrado na figura 52, o sobrenadante controle de células de Schwann estimuladas com a cepa de *M. bovis* BCG não apresentou nenhum efeito negativo na viabilidade dessas células.

Por outro lado, todas as condições na presença de PGL-1 promoveram a drástica redução na viabilidade dos neuroblastomas (figura 52). Assim, os resultados sugerem que o PGL-1 per se é capaz de promover a síntese de lipídios presentes no sobrenadante das células hospedeiras, culminando no detrimento neuronal.



52. Viabilidade de neurônios de linhagem após adição de sobrenadante de células de Schwann estimuladas com BCG-PGL-1. A viabilidade dos neurônios foi avaliada após 24 horas da adição do sobrenadante de células de Schwann infectada com *M. leprae* vivo e estimuladas com BCG, BCG-PGL1, beads vazia e beads-PGL1. O gráfico é expresso em média e desvio padrão da análise de 4 experimentos independentes em triplicata. A análise estatística foi calculada pelo teste de Kruskal-Wallis (p* 0,0269; ** 0,011 e **** <0,0001).

6. Discussão

No presente trabalho, demonstramos com uso de glicose marcada ($^{13}\text{C}_6$) que o *M. leprae* tem acesso à glicose da célula de Schwann e a utiliza para a biossíntese da maioria dos seus aminoácidos. Além disso, o *M. leprae* promove o desvio do lactato para a síntese lipídica nessas células. Nesse contexto, grande parte do traçador radioativo (^{14}C) foi encontrado no sobrenadante da cultura infectada. Demonstramos que lipídios presentes no sobrenadante de células de Schwann infectadas promovem a diminuição da viabilidade neuronal e impacto negativo na morfologia dessas células. O aumento na concentração de lactato no sobrenadante da célula de Schwann, através do tratamento com 6ANAM ou pela suplementação direta deste metabólito, demonstrou ser importante para os neurônios, pois foi capaz de reduzir a queda da viabilidade dessas células. Coletivamente, os resultados sugerem que alterações no metabolismo das células de Schwann, principais hospedeiras do *M. leprae*, podem estar correlacionadas com o desenvolvimento de neuropatia na hanseníase.

Foi demonstrado por Medeiros e col. (2016) que a infecção pelo *M. leprae* promove o aumento da captação de glicose na célula de Schwann, no entanto, até o momento não era compreendido se o bacilo seria capaz de utilizá-la como fonte de carbono. Os resultados demonstraram aminoácidos enriquecidos com ^{13}C na fração contendo *M. leprae* intracelular, indicando que o bacilo tem acesso ao carbono oriundo da glicose. Ainda, o perfil de marcação da maioria dos aminoácidos do *M. leprae* foi diferente daquele observado nas células de Schwann infectadas, resultado que reflete a capacidade do *M. leprae* em biossintetizar seus próprios aminoácidos. Estudos anteriores demonstraram que o *M. leprae* apresenta o anabolismo de aminoácidos preservado, corroborando com as nossas análises (Cole et al., 2001; Marques et al., 2008). O ensaio de proteômica demonstrou que o *M. leprae* apresenta enzimas envolvidas na síntese de aminoácidos como lisina, aspartato, cisteína, treonina, histidina, valina, isoleucina, prolina e treonina (Marques et al., 2008).

O estudo anterior de Miyamoto e col. (2016) revelou o acúmulo de aminoácido nas análises por eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas (CE-MS) do coxim plantar de camundongos infectado pelo *M. leprae*, em comparação com camundongos não infectados. Cerca de 70% dos metabólitos avaliados eram aminoácidos, o que levou a discussão sobre a capacidade do *M. leprae* em sintetizar seus aminoácidos ou adquiri-los do hospedeiro. Em nossos resultados, não houve

incorporação de ^{13}C quando o bacilo foi incubado em meio RPMI sem a presença das células de Schwann (cultura axênica), o que confirmou que a incorporação de ^{13}C pelo *M. leprae* está ocorrendo via célula hospedeira, possivelmente tratando-se de um intermediário da glicólise (figura 29). Assim, demonstramos que o *M. leprae* utiliza carbonos oriundos da metabolização da glicose do hospedeiro como fonte de carbono para a biossíntese de seus aminoácidos. Diferente do observado no *M. leprae*, *M. tuberculosis* e macrófagos apresentaram o perfil semelhante de isotopômeros nos aminoácidos analisados, indicando que o *M. tuberculosis* importa a maioria de seus aminoácidos diretamente da célula hospedeira (Borah et al., 2019).

Previamente demonstramos a expressão aumentada da enzima glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD), principal enzima da via das pentoses fosfato, em células de Schwann infectadas e em biópsias de nervo e pele de pacientes (Medeiros et al., 2016). Assim, buscamos por aminoácidos sintetizados a partir de precursores da via a fim de observar se houve aumento de enriquecimento de ^{13}C , reforçando a hipótese do desvio de fluxo de carbono para a via. A fenilalanina e a tirosina são aminoácidos sintetizados a partir da combinação de carbonos da eritrose 4-fosfato, da via das pentoses e do fosfoenolpiruvato da via glicolítica. O perfil de isotopômeros presentes na fenilalanina é diferente entre o *M. leprae* e o *M. tuberculosis*. Nas análises foi observado que o isotopômero mais alto para este aminoácido no *M. leprae* intracelular foi M+6, ou seja, seis átomos de carbono marcados com o isótopo, apesar de apenas o carbono 6 da glicose encontrar-se marcado (figura 31). Esse achado indica a ativação da via das pentoses durante a infecção, que através das reações das enzimas transaldolase e transcetolase, é capaz de alterar a ordenação dos carbonos da glicose, tornando possível a incorporação de vários carbonos marcados em uma mesma molécula de fenilalanina.

Com relação à incorporação de ^{13}C entre a célula de Schwann controle e infectada pelo *M. leprae*, não foram observadas diferenças significativas entre os aminoácidos com mais de 1% de enriquecimento observado na figura 30. Não obstante, mesmo apresentando valor abaixo da análise, o aminoácido tirosina apresentou diferenças no perfil de marcação de carbono (Borah et al., 2019). Em conjunto, os dados sugerem que a infecção estimula o aumento do fluxo de carbono para a via das pentoses fosfato, visto principalmente pelo perfil de isotopômeros em fenilalanina no *M. leprae* intracelular.

Acreditamos que o aumento do fluxo de carbono para a via das pentoses fosfato seja um mecanismo adaptativo do *M. leprae* para favorecer sua sobrevivência no hospedeiro. Na primeira reação da via, catalisada pela enzima G6PD, é formado NADPH, molécula reduzida utilizada na biossíntese de lipídios e no sistema antioxidante mantido pela redução da glutatona, ambos demonstrados aumentados em células infectadas (Mattos et al., 2010; Mattos et al., 2011; Medeiros et al., 2016). Além da via das pentoses, a conversão do malato em piruvato, catalisada pela enzima málica, também gera NADPH e sua expressão foi observada aumentada em nervos de pacientes com hanseníase com a forma clínica multibacilar (LL) e células de Schwann infectadas (Medeiros et al., 2016).

A indução do acúmulo lipídico em corpúsculos no hospedeiro não é uma característica restrita do *M. leprae*, sabe-se que diferentes patógenos intracelulares também induzem o acúmulo lipídico em seus hospedeiros (Vallochi et al., 2018). Inicialmente acreditava-se que o *M. leprae* poderia utilizar o colesterol presente nessas organelas como fonte de carbono, no entanto, foi demonstrado por Marques e col. (2015) que o bacilo é incapaz de degradar os anéis de esterol e a cadeia lateral desse lipídio. Apesar disso, o *M. leprae* tem conservada a capacidade de oxidar o colesterol em colestenona e, como o bacilo não apresenta o operon *mce4* responsável por codificar o sistema de transporte de esteróis em micobactérias, sugere-se que essa oxidação ocorra na superfície celular bacteriana, alterando a permeabilidade de membrana pela interação com ácidos micólicos (Marques et al., 2015). A forte modulação do metabolismo lipídico do hospedeiro parece estar ligada ao potencial sítio de infecção e persistência do *M. leprae*. Dados ainda não publicados do nosso grupo demonstraram a presença de antígenos do *M. leprae* no tecido adiposo subcutâneo de pacientes multibacilares (Dos Reis, 2016).

Outro mecanismo adaptativo do *M. leprae* que pode estar relacionado com a sua sobrevivência no hospedeiro é a modulação da respiração celular (Medeiros et al., 2016). Os complexos I e III da cadeia respiratória mitocondrial são os maiores contribuintes do vazamento de elétrons, contribuindo para o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Beal et al., 2007). Assim, a diminuição do consumo de oxigênio pelas células infectadas gerado pela redução da cadeia respiratória protege o hospedeiro contra danos por ROS e favorece a permanência do *M. leprae*. Nesse contexto de impacto mitocondrial gerado pelo patógeno, evidências crescentes têm

associado disfunções mitocondriais de células gliais no desenvolvimento de neuropatias (Rose et al., 2017).

As células de Schwann estão intimamente associadas a todos os axônios dos nervos periféricos e são essenciais para sua preservação e sobrevivência. A depleção da cadeia respiratória nas células de Schwann em animais (Tfam-SCKO) foi demonstrada por causar desmielinização e degeneração axonal (Viader et al., 2011). Para testar essa hipótese na hanseníase, utilizamos os ensaios com os neurônios suplementados com o sobrenadante de células de Schwann infectadas e observamos a drástica redução da viabilidade dessas células (figura 32). Para validar o resultado observado com o MTT, neurônios primários também foram suplementados com o sobrenadante de células de Schwann. O tratamento prejudicou a arborização e o comprimento máximo atingido pelos neuritos (figura 36 e 37).

Alguns estudos se concentram na identificação das vias responsáveis pelo crescimento e ramificação dos neurônios. Nesse sentido, a importância da proteína β -catenina no crescimento de neurônios centrais e periféricos também têm sido destacadas. O acúmulo de β -catenina no citoplasma celular leva à transcrição do fator Wnt, levando a ativação de genes de proliferação celular. Em culturas *in vitro* de neurônios hipocâmpais, a fosforilação da β -catenina nos resíduos Y654 e Y142 aumentou o crescimento e ramificação de neuritos (Gao et al., 2009). Ainda, em gânglio da raiz dorsal a inibição de β -catenina resultou na inibição de crescimento axonal (Duraikannu et al., 2018). Em nossos resultados, o impacto maior do sobrenadante infectado foi na ramificação dos neuritos (figura 37). Foi demonstrado em estudos *in vitro* com neurônios do hipocampo que a complexidade da arborização de neuritos é regulada por mTOR via PI3K-Akt e seus efetores BDNF e Ras. A inibição de mTOR resulta na diminuição da complexidade da ramificação (Jaworski et al., 2005; Liu et al., 2019). Assim, uma análise mais profunda das vias de sinalização abaladas nos neurônios a partir do tratamento com o sobrenadante infectado ainda precisa ser explorada em nosso modelo.

Em nosso trabalho, observamos que o sobrenadante da célula infectada pelo *M. leprae* apresenta menor concentração de lactato (figura 33), o que é corroborado pela literatura em que foi mostrado a diminuição da expressão gênica da enzima envolvida em sua síntese (Medeiros et al., 2016). O lactato é o principal metabólito liberado pela glia para suprir o axônio, sua importância tem sido revelada em ensaios após a lesão axonal.

Babetto e col. (2020) demonstraram que em resposta ao dano axonal, a célula de Schwann adota um fenótipo hiperglicolítico através da ativação da via de sinalização mTORC1-Hif1 α / c-Myc. A ativação da via leva ao aumento da liberação de lactato ao axônio lesionado. A depleção do transportador de monocarboxilato 1 (MCT1) em células de Schwann gerou o atraso na recuperação de nervos isquiático de camundongos, indicando mais uma vez a importância do lactato para axônio lesionado (Morrison et al., 2015).

Em nossos ensaios, a suplementação de lactato preveniu a diminuição da viabilidade dos neurônios (figura 38) e a complexidade das ramificações de neurônios primários (figuras 37). Desse modo, acreditamos que a interrupção do suporte metabólico do metabolismo fermentativo nas células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* pode contribuir para a neuropatia observada na hanseníase. O efeito benéfico com o tratamento com o inibidor da G6PD, 6ANAM, pode ser explicado pela restauração dos níveis de lactato no sobrenadante (figura 33).

Com a utilização de lactato marcado com carbono radioativo (^{14}C), observamos o desvio do metabólito para a síntese lipídica nas células hospedeiras (figura 39), o que foi confirmado pelo aumento de corpúsculos lipídicos em células de Schwann infectadas quando em contato com lactato (figura 40). Os lipídios intracelulares com maior incorporação do carbono radioativo foram triacilglicerol, fosfolípido e ácido graxo (figura 40). Trabalhos anteriores demonstraram que os lipídios acumulados nos corpúsculos lipídicos são compostos por fosfolípidos oxidados do hospedeiro, colesterol e ácidos graxos (Cruz et al., 2008; Mattos et al., 2014), podendo sua maior abundância nas células infectadas explicar esse aumento.

Curiosamente, sinais de ^{14}C foram observados em lipídios presentes no sobrenadante celular, entre os mais aumentados nas células de Schwann infectadas estão ácidos graxos, 1,3 diacilglicerol, 1,2 diacilglicerol e oxisterol (figura 41). Nesse contexto, foi demonstrado por Viader e col. (2013) que o dano axonal gerado pela disfunção do metabolismo mitocondrial de células de Schwann é causado pela oxidação de lipídios da mielina, gerando o acúmulo de acilcarnitinas de cadeia longa. As acilcarnitinas são liberadas das células de Schwann para o axônio, alterando propriedades de membrana axonal, assim como de canais iônicos. Ainda, a adição de palmitoil-carnitina em culturas de gânglio da raiz dorsal levou ao aumento do influxo de Ca^{+2} seguido do aparecimento de bolhas axonais, indicando sua degeneração (Viader et al., 2013). Resultados semelhantes foram observados no tratamento de

gânglios com palmitato, no qual foi observado a despolarização e inibição do tráfego de mitocondrial nos axônios (Rumora et al., 2018). Em animais Tfam-SCKO foi observado que a dependência do metabolismo glial é sentido primeiro em fibras amielínicas (Viader et al., 2013), um dado interessante visto que na hanseníase essas fibras são afetadas inicialmente (Einar & Brakel, 2008).

Um trabalho recente de Mietto e col. (2019), demonstrou que o *M. leprae* acelerou a taxa de degradação da mielina por mielínofagia em células de Schwann primárias isoladas de camundongos. Além disso, concomitante com a degradação da mielina foi observado o aumento de corpúsculos lipídicos nas células, sugerindo este como um evento contribuinte para a desmielinização e corroborando com a modulação do metabolismo lipídico nessas células.

Em nossos experimentos, a queda da viabilidade de neurônios tratados com lipídios presentes no sobrenadante de células de Schwann infectadas, previamente descritas por apresentarem a cadeia respiratória abalada (Medeiros et al., 2016), é apoiado pelos achados da literatura discutidos acima. O fracionamento do sobrenadante e o tratamento da fração de maior toxicidade em condições de desnaturação proteica não evitaram a neurotoxicidade da fração (figura 46), corroborando com o resultado anterior onde observamos maior neurotoxicidade na fração lipídica destes sobrenadantes (figura 42).

O pico de eluição dos lipídeos neurotóxicos ocorreu na fração 41, que parece ser rica em albumina (figura 45). A albumina é a principal proteína de ligação aos ácidos graxos nos fluidos extracelulares (Van der Vusse, 2009; Feingold, 2019). Em soluções aquosas, como o plasma sanguíneo, os ácidos graxos encontram-se ligados à proteínas como a albumina, o que ocorre devido a sua baixa solubilidade. No organismo, os ácidos graxos podem ser transportados sob a forma de triacilgliceróis ou como ácidos graxos esterificados. O triacilglicerol é o principal componente lipídico das lipoproteínas, tais como quilomícrons e lipoproteínas de densidade muito baixa (*very low-density lipoprotein* -VLDL) (Van der Vusse, 2009). Assim, mais estudos precisam ser feitos a partir do nosso modelo para verificar presença da albumina nessas frações bem como o seu envolvimento no transporte lipídico nas células sobre a neurotoxicidade mediada pela célula de Schwann infectada. Além disso, foi demonstrado em ensaios *in vivo* que a albumina *per se* causa a morte de neurônios hipocâmpais em camundongos (Zanhua et al., 2016). Em nossos ensaios por MTT, a neurotoxicidade foi normalizada pelas culturas que receberam o sobrenadante de

células de Schwann controle. No entanto, em relação aos neurônios não tratados, os que receberam o sobrenadante controle apresentam queda de cerca de 15-20% de viabilidade, o que pode ser explicado pela presença de albumina nos sobrenadantes.

Foi demonstrado por Longfei et al. (2018) que as células de Schwann estimuladas com concentrações elevadas de glicose liberam exossomos contendo microRNAs que impactam o crescimento axonal, sugerindo a contribuição dos exossomos para o desenvolvimento da neuropatia diabética. Em nosso modelo, a adição em neurônios de exossomos purificados do sobrenadante de células de Schwann infectadas não causou nenhum efeito sobre viabilidade neuronal (figura 48). Dessa forma, acreditamos que a liberação dessas microvesículas não está associada ao nosso modelo.

Surpreendentemente, observamos que o sobrenadante de células de Schwann estimuladas com o *M. leprae* morto por irradiação utilizando a MOI de 100:1 foi capaz de promover o efeito neurotóxico (figura 48). Nesse contexto, Acosta e col. (2018) compararam a internalização de bacilos em células de Schwann utilizando diferentes valores de MOI. Enquanto somente 50% dos bacilos mortos são internalizados na MOI 50:1, 100% foi observado dentro das células de Schwann na MOI 100:1. Acreditamos que o surgimento de lipídios neurotóxicos é devido as mudanças no metabolismo de células de Schwann infectadas observadas por nosso grupo (Medeiros et al., 2016). A capacidade do sobrenadante estimulado com *M. leprae* morto também diminuir a viabilidade dos neurônios, sugere que os lipídios também são gerados nesse caso.

Como a irradiação preserva os componentes estruturais do bacilo, buscamos nos aprofundar na contribuição do PGL-1, o componente do envelope celular do *M. leprae* mais associado ao tropismo pelas células de Schwann (Adams et al., 2000; Ng et al., 2000). O PGL-1 se liga a cadeia $\alpha 2$ da laminina 2, principal componente da lâmina basal das células de Schwann (Rambukkana et al., 1997).

Observamos que o sobrenadante das células estimuladas com PGL-1, seja com os beads ou com a cepa de *M. bovis* BCG recombinante, capaz de expressar o glicolípido, foi capaz de diminuir a viabilidade de neurônios (figura 52). Um estudo passado demonstrou que após 24 horas de incubação, as beads com PGL-1 são vistas dentro das células de Schwann (Ng et al., 2000). Além disso, Dias e col. (2018) demonstraram que o PGL-1 é capaz de promover o aumento de corpúsculo lipídico nas células de Schwann, via receptor ativado por proliferadores de peroxissomo gama

(PPAR γ) e receptor de manose CD206, indicando que esse componente *per se* promove modulações metabólicas na célula hospedeira. Um experimento *in vivo* utilizando peixe zebra demonstrou que o contato com PGL-1 estimula o aumento da síntese de óxido nítrico pelos macrófagos, e que o efeito dessa estimulação resulta na degeneração axonal e desmielinização (Madigan et al., 2017).

A partir da análise dos principais pontos modulados na célula de Schwann infectada com *M. leprae* descrito por Medeiros e col. (2016), observamos que o PGL-1 também é capaz de desencadear o aumento na captação de glicose (figura 49) e diminuição do potencial mitocondrial (figura 50) e diminuição da fermentação (figura 51). Assim, os resultados sugerem que os lipídios prejudiciais aos neurônios também possam estar presentes nessas condições.

Em conjunto, os dados fornecem evidências de que modulações do metabolismo glicolítico das células de Schwann promovidas pelo PGL-1 do *M. leprae*, a saber: desvio da síntese de lactato e liberação de lactato para a síntese e liberação de ácidos graxos, podem contribuir para o desenvolvimento da neuropatia neural observada na hanseníase. Dessa forma, novas estratégias farmacológicas para a melhoria do fenótipo observado nos neurônios podem ser direcionadas por meio do impacto da síntese lipídica nas células de Schwann.

7. Conclusão

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

- O *M. leprae* é capaz de utilizar a glicose hospedeira como fonte de carbono para a biossíntese de seus aminoácidos;
- A diminuição do metabolismo fermentativo das células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* afeta a viabilidade de neurônios;
- Nas células de Schwann infectadas pelo *M. leprae*, o lactato é desviado para a síntese lipídica;
- Lipídios presentes no sobrenadante de células de Schwann infectadas apresentam toxicidade a neurônios primários e de linhagem;
- O efeito neuro-protetor observado durante a inibição da via das pentoses ocorre a partir da diminuição da síntese lipídica e subsequente recuperação metabólica da célula de Schwann infectada.

8. Referências bibliográficas

- Abe, I., Ochiai, N., Ichimura, H., Tsujino, A., Sun, J., & Hara, Y. (2004). Internodes can nearly double in length with gradual elongation of the adult rat sciatic nerve. *Journal of Orthopaedic Research*, *22*(3), 571–577. <https://doi.org/10.1016/j.orthres.2003.08.019>
- Abram, S. E., Yi, J., Fuchs, A., & Hogan, Q. H. (2006). Permeability of injured and intact peripheral nerves and dorsal root ganglia. *Anesthesiology*, *105*(1), 146–153. <https://doi.org/10.1097/00000542-200607000-00024>
- Aguilar-Ayala, D. A., Tilleman, L., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Palomino, J. C., Vandamme, P., Gonzalez-Y-Merchand, J. A., & Martin, A. (2017). The transcriptome of *Mycobacterium tuberculosis* in a lipid-rich dormancy model through RNAseq analysis. *Scientific Reports*, *7*(1), 17665. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17751-x>
- Alves, L., De Mendonça Lima, L., Da Silva Maeda, E., Carvalho, L., Holy, J., Sarno, E. N., Pessolani, M. C. V., & Barker, L. P. (2004). *Mycobacterium leprae* infection of human Schwann cells depends on selective host kinases and pathogen-modulated endocytic pathways. *FEMS Microbiology Letters*, *238*(2), 429–437. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.08.007>
- Antunes, S., Jardim, M. R., Vital, R. T., Pascarelli, B. M., Nery, J. A., Amadeu, T. P., Sales, A. M., Costa, E. F., & Sarno, E. N. (2019). Fibrosis: a distinguishing feature in the pathology of neural leprosy. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *114*(6), 1–8. <https://doi.org/10.1590/0074-02760190056>
- Arthur-Farraj, P. J., Latouche, M., Wilton, D. K., Quintes, S., Chabrol, E., Banerjee, A., Woodhoo, A., Jenkins, B., Rahman, M., Turmaine, M., Wicher, G. K., Mitter, R., Greensmith, L., Behrens, A., Raivich, G., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2012). c-Jun Reprograms Schwann Cells of Injured Nerves to Generate a Repair Cell Essential for Regeneration. *Neuron*, *75*(4), 633–647. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.06.021>
- Babetto, E., Wong, K. M., & Beirowski, B. (2020). A glycolytic shift in Schwann cells supports injured axons. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-0689-4>
- Balamayooran, G., Pena, M., Sharma, R., & Truman, R. W. (2015). The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. *Clinics in Dermatology*, *33*(1), 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.07.001>

- Bandeira, S. S., Pires, C. A., & Quaresma, J. A. S. (2017). Nerve Damage in Young Patients with Leprosy Diagnosed in an Endemic Area of the Brazilian Amazon: A Cross-Sectional Study. *The Journal of Pediatrics*, *185*, 143–148. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2017.02.035>
- Beirowski, B. (2013). Concepts for regulation of axon integrity by enwrapping glia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *7*(DEC), 1–22. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00256>
- Beirowski, B., Babetto, E., Golden, J. P., Chen, Y. J., Yang, K., Gross, R. W., Patti, G. J., & Milbrandt, J. (2014). Metabolic regulator LKB1 is crucial for Schwann cell-mediated axon maintenance. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.3809>
- Birchmeier, C., & Nave, K. A. (2008). Neuregulin-1, a key axonal signal that drives schwann cell growth and differentiation. *Glia*, *56*(14), 1491–1497. <https://doi.org/10.1002/glia.20753>
- Boerboom, A., Dion, V., Chariot, A., & Franzen, R. (2017). Molecular Mechanisms Involved in Schwann Cell Plasticity. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, *10*. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00038>
- Boggs, J. M., & Moscarello, M. A. (1978). *STRUCTURAL ORGANIZATION OF THE HUMAN MYELIN MEMBRANE* The myelin membrane is composed of proteins (20--30 %) and lipids (70-80 %). Although the amount of lipid on a weight basis exceeds that of protein by a factor of 3-4 , the propertics of the membr. *515*, 1–21.
- Borah K, Girardi KDCV, Mendum TA, et al. Intracellular Mycobacterium leprae Utilizes Host Glucose as a Carbon Source in Schwann Cells. *mBio*. 2019;10(6):e02351-19. Published 2019 Dec 17. doi:10.1128/mBio.02351-19
- Bouçanova, F., & Chrast, R. (2020). Metabolic Interaction Between Schwann Cells and Axons Under Physiological and Disease Conditions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, *14*(May), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fncel.2020.00148>
- Brown, A. M., Evans, R. D., Black, J., & Ransom, B. R. (2012). Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function. *Annals of Neurology*, *72*(3), 406–418. <https://doi.org/10.1002/ana.23607>
- Butt, A., & Verkhratsky, A. (2018). Neuroglia: Realising their true potential. *Brain and Neuroscience Advances*, *2*, 239821281881749. <https://doi.org/10.1177/2398212818817495>

Carvalho, C. R., Oliveira, J. M., & Reis, R. L. (2019). Modern Trends for Peripheral Nerve Repair and Regeneration: Beyond the Hollow Nerve Guidance Conduit. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 7(November), 1–30. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00337>

Chen, Y., Haacke, E. M., & Li, J. (2019). Peripheral nerve magnetic resonance imaging. *F1000Research*, 8, 1803. <https://doi.org/10.12688/f1000research.19695.1>

Cho, S. N., Yanagihara, D. L., Hunter, S. W., Gelber, R. H., & Brennan, P. J. (1983). Serological specificity of phenolic glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and use in serodiagnosis of leprosy. *Infection and Immunity*, 41(3), 1077–1083. <https://doi.org/10.1128/IAI.41.3.1077-1083.1983>

Cole, S. T., Eiglmeier, K., Parkhill, J., James, K. D., Thomson, N. R., Wheeler, P. R., Honoré, N., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Mungall, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R. M., Devlin, K., Duthoy, S., Feltwell, T., ... Barrell, B. G. (2001). Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*, 409(6823), 1007–1011. <https://doi.org/10.1038/35059006>

Cruz D, Watson AD, Miller CS, Montoya D, Ochoa MT, Sieling PA, Gutierrez MA, Navab M, Reddy ST, Witztum JL, Fogelman AM, Rea TH, Eisenberg D, Berliner J, Modlin RL. Host-derived oxidized phospholipids and HDL regulate innate immunity in human leprosy. *J Clin Invest*. 2008 Aug;118(8):2917-28. doi: 10.1172/JCI34189. PMID: 18636118; PMCID: PMC2467381.

Cummings BS, Schnellmann RG. Measurement of cell death in mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol*. 2004 Sep 1;Chapter 12:Unit 12.8. doi: 10.1002/0471141755.ph1208s25. PMID: 22294120; PMCID: PMC3874588

de Mattos, K. A., Sarno, E. N., Pessolani, M. C. V., & Bozza, P. T. (2012). Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: Multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(SUPPL.1), 156–166. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900023>

Dias, A. A., Raze, D., de Lima, C. S., Marques, M. A. de M., Drobecq, H., Debie, A. S., Ribeiro-Guimarães, M. L., Biet, F., & Pessolani, M. C. V. (2012). Mycobacterial laminin-binding histone-like protein mediates collagen-dependent cytoadherence. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(SUPPL.1), 174–182.

<https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900025>

Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TL, Batista-Silva LR, Rosa PS, Toledo-Pinto TG, Costa FDMR, Lara FA, Rodrigues LS, Mattos KA, Sarno EN, Bozza PT, Guilhot C, de Berrêdo-Pinho M, Pessolani MCV. PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. *PLoS Pathog.* 2018 Jul 6;14(7):e1007151. doi: 10.1371/journal.ppat.1007151. PMID: 29979790; PMCID: PMC6056075.

Domenech-Estevez, E., Baloui, H., Repond, C., Rosafio, K., Medard, J.-J., Tricaud, N., Pellerin, L., & Chrast, R. (2015). Distribution of Monocarboxylate Transporters in the Peripheral Nervous System Suggests Putative Roles in Lactate Shuttling and Myelination. *Journal of Neuroscience*, 35(10), 4151–4156. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3534-14.2015>

Dos Reis, S. O tecido adiposo como sítio de infecção por *Mycobacterium leprae*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular)- Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, p.58. 2016.

Drutz, D. J., O'Neill, S. M., & Levy, L. (1974). Viability of blood borne *Mycobacterium leprae*. *Journal of Infectious Diseases*, 130(3), 288–292. <https://doi.org/10.1093/infdis/130.3.288>

Duraikannu, A., Martinez, J.A., Chandrasekhar, A. *et al.* Expression and Manipulation of the APC- β -Catenin Pathway During Peripheral Neuron Regeneration. *Sci Rep* 8, 13197 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31167-1>

Esposito, M. F., Malayil, R., Hanes, M., & Deer, T. (2019). Unique Characteristics of the Dorsal Root Ganglion as a Target for Neuromodulation. *Pain Medicine (United States)*, 20, S23–S30. <https://doi.org/10.1093/pm/pnz012>

Evans, R. D., Brown, A. M., & Ransom, B. R. (2013). Glycogen function in adult central and peripheral nerves. In *Journal of Neuroscience Research*. <https://doi.org/10.1002/jnr.23229>

Feinberg, K., Eshed-Eisenbach, Y., Frechter, S., Amor, V., Salomon, D., Sabanay, H., Dupree, J. L., Grumet, M., Brophy, P. J., Shrager, P., & Peles, E. (2010). A Glial Signal Consisting of Gliomedin and NrCAM Clusters Axonal Na⁺ Channels during the Formation of Nodes of Ranvier. *Neuron*, 65(4), 490–502.

<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.02.004>

Feldman, E. L., Nave, K. A., Jensen, T. S., & Bennett, D. L. H. (2017). New Horizons in Diabetic Neuropathy: Mechanisms, Bioenergetics, and Pain. *Neuron*, 93(6), 1296–1313. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.02.005>

Feltri, M. L., Poitelon, Y., & Previtali, S. C. (2016). How Schwann Cells Sort Axons: New concepts. *Neuroscientist*, 22(3), 252–265. <https://doi.org/10.1177/1073858415572361>

Femina, L. L., Soler, A. C. P., Nardi, S. M. T., & Paschoal, V. D. (2007). Lepra para a hanseníase: a visão do portador sobre a mudança de terminologia. *Hansen. Int*, 32(1), 37–48.

Feingold KR. Introduction to Lipids and Lipoproteins. [Updated 2021 Jan 19]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, et al., editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDTText.com, Inc.; 2000-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK305896/>

Fischer M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2017 Aug;15(8):801-827. doi: 10.1111/ddg.13301. PMID: 28763601.

Fledrich, R., Kunjl, T., Nave, K. A., & Stassart, R. M. (2019). Axo-glial interdependence in peripheral nerve development. *Development (Cambridge, England)*, 146(21), 1–12. <https://doi.org/10.1242/dev.151704>

Gao, Z., Ure, K., Ables, J. et al. *Neurod1* is essential for the survival and maturation of adult-born neurons. *Nat Neurosci* 12, 1090–1092 (2009). <https://doi.org/10.1038/nn.2385>

Gomez-Valero, L., Rocha, E. P. C., Latorre, A., & Silva, F. J. (2007). Reconstructing the ancestor of *Mycobacterium leprae*: The dynamics of gene loss and genome reduction. *Genome Research*, 17(8), 1178–1185. <https://doi.org/10.1101/gr.6360207>

Grinspan, J. B., Marchionni, M. A., Reeves, M., Coulaloglou, M., & Scherer, S. S. (1996). Axonal interactions regulate Schwann cell apoptosis in developing peripheral nerve: Neuregulin receptors and the role of neuregulins. *Journal of Neuroscience*, 16(19), 6107–6118. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.16-19-06107.1996>

Grothe, C., Meisinger, C., & Claus, P. (2001). In vivo expression and localization of the fibroblast growth factor system in the intact and lesioned rat peripheral nerve and spinal

ganglia. *Journal of Comparative Neurology*, 434(3), 342–357.
<https://doi.org/10.1002/cne.1181>

Halestrap, A. P., & Price, N. T. (1999). The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *The Biochemical Journal*, 343 Pt 2, 281–299. <https://doi.org/10.2118/161993-ms>

Hallermann, S., De Kock, C. P. J., Stuart, G. J., & Kole, M. H. P. (2012). State and location dependence of action potential metabolic cost in cortical pyramidal neurons. *Nature Neuroscience*, 15(7), 1007–1014. <https://doi.org/10.1038/nn.3132>

Hartline, D. K., & Colman, D. R. (2007). Rapid Conduction and the Evolution of Giant Axons and Myelinated Fibers. *Current Biology*, 17(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.11.042>

Hess, S., & Rambukkana, A. (2015). Bacterial-induced cell reprogramming to stem cell-like cells: new premise in host–pathogen interactions. *Current Opinion in Microbiology*, 23, 179–188. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2014.11.021>

Hess, S., & Rambukkana, A. (2019). Cell Biology of Intracellular Adaptation of Mycobacterium leprae in the Peripheral Nervous System. In *Bacteria and Intracellularly* (Vol. 176, Issue 1, pp. 247–266). American Society of Microbiology. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0020-2019>

Hollenbeck, P. J., & Saxton, W. M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *Journal of Cell Science*, 118(23), 5411–5419. <https://doi.org/10.1242/jcs.02745>

India, G. of. (2009). Training Manual for Medical Officers. In *Health (San Francisco)*.

Jaworski J, Spangler S, Seeburg DP, Hoogenraad CC, Sheng M. Control of dendritic arborization by the phosphoinositide-3'-kinase-Akt-mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci*. 2005 Dec 7;25(49):11300-12. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2270-05.2005. PMID: 16339025; PMCID: PMC6725892.

Jessen, K. R., & Mirsky, R. (2016). The repair Schwann cell and its function in regenerating nerves. *Journal of Physiology*, 594(13), 3521–3531. <https://doi.org/10.1113/JP270874>

Jessen, Kristjan R., & Mirsky, R. (2005). The origin and development of glial cells in peripheral nerves. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(9), 671–682.

<https://doi.org/10.1038/nrn1746>

Jessen, Kristjan R., & Mirsky, R. (2019a). Schwann cell precursors; multipotent glial cells in embryonic nerves. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12(March), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2019.00069>

Jessen, Kristjan R., & Mirsky, R. (2019b). The success and failure of the schwann cell response to nerve injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13(February), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00033>

Jessen, Kristján R., Mirsky, R., & Lloyd, A. C. (2015). Schwann cells: Development and role in nerve repair. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(7), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020487>

Jha, M. K., & Morrison, B. M. (2018). Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: New insights into the role of nervous system metabolic transporters. *Experimental Neurology*, 309(1), 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.07.009>

Job, C. K., Jayakumar, J., Kearney, M., & Gillis, T. P. (2008). Transmission of leprosy: A study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(3), 518–521. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.518>

Kanda, T. (2013). *Biology of the blood – nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies*. 208–212. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2012-302312>

Kidd, G. J., Ohno, N., & Trapp, B. D. (2013). Biology of Schwann cells. In *Handbook of Clinical Neurology* (1st ed., Vol. 115). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52902-2.00005-9>

Kucenas, S. (2015). Perineurial glia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(6), 1–14. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020511>

Kumar, S., Alexander, M., & Gnanamuthu, C. (2006). Cranial nerve involvement in patients with leprous neuropathy. *Neurology India*, 54(3), 283–285. <https://doi.org/10.4103/0028-3886.27154>

La Marca, R., Cerri, F., Horiuchi, K., Bachi, A., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Blobel, C. P., Quattrini, A., Salzer, J. L., & Taveggia, C. (2011). TACE (ADAM17) inhibits Schwann cell myelination. *Nature Neuroscience*, 14(7), 857–865.

<https://doi.org/10.1038/nn.2849>

Lane, J. E., Balagon, M. V., Dela Cruz, E. C., Abalos, R. M., Tan, E. V., Cellona, R. V., Sadaya, P. G., Walsh, G. P., & Walsh, D. S. (2006). Mycobacterium leprae in untreated lepromatous leprosy: more than skin deep. *Clinical and Experimental Dermatology*, 31(3), 469–470. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2006.02075.x>

Langert, K. A., & Brey, E. M. (2018). Strategies for targeted delivery to the peripheral nerve. *Frontiers in Neuroscience*, 12(NOV), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00887>

Lee, A. G. (2001). Myelin: Delivery by raft. *Current Biology*, 11(2), 60–62. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(01\)00008-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00008-2)

Lehninger, T. M., Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 6ª Edição, 2014. Ed. Artmed.

Liu, Q., Wang, X., & Yi, S. (2018). Pathophysiological changes of physical barriers of peripheral nerves after injury. *Frontiers in Neuroscience*, 12(AUG), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00597>

Liu S, Jia J, Zhou H, Zhang C, Liu L, Liu J, Lu L, Li X, Kang Y, Lou Y, Cai Z, Ren Y, Kong X, Feng S. PTEN modulates neurites outgrowth and neuron apoptosis involving the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Mol Med Rep*. 2019 Nov;20(5):4059-4066. doi: 10.3892/mmr.2019.10670. Epub 2019 Sep 10. PMID: 31702028; PMCID: PMC6797942.

Liu Z, Liu J, Wang S, Liu S, Zhao Y. Neuronal uptake of serum albumin is associated with neuron damage during the development of epilepsy. *Exp Ther Med*. 2010. Aug;12(2):695-701. doi: 10.3892/etm.2016.3397. Epub 2016 May 26. PMID: 27446263; PMCID: PMC4950244.

Llobet Rosell, A., & Neukomm, L. J. (2019). Axon death signalling in Wallerian degeneration among species and in disease. *Open Biology*, 9(8), 190118. <https://doi.org/10.1098/rsob.190118>

Locasale, J. W., & Cantley, L. C. (2010). Altered metabolism in cancer. *BMC Biology*, 8(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-88>

Lockwood, D. N. J., & Kumar, B. (2004). Treatment of leprosy. *British Medical Journal*,

328(7454), 1447–1448. <https://doi.org/10.1136/bmj.328.7454.1447>

Lopez-Verrilli, M. A., & Court, F. A. (2012). Transfer of vesicles from Schwann cells to axons: A novel mechanism of communication in the peripheral nervous system. In *Frontiers in Physiology*. <https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00205>

Madigan, C. A., Cambier, C. J., Kelly-Scumpia, K. M., Sagasti, A., Modlin, R. L., Ramakrishnan, L., Scumpia, P. O., Cheng, T.-Y., Zailaa, J., Bloom, B. R., Moody, D. B., & Smale, S. T. (2017). A Macrophage Response to Mycobacterium leprae Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. *Cell*, 170, 973–985. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.030>

Magistretti, P. J., Sorg, O., Yu, N., Martin, J.-L., & Pellerin, L. (1993). Neurotransmitters Regulate Energy Metabolism in Astrocytes: Implications for the Metabolic Trafficking between Neural Cells. *Developmental Neuroscience*, 15(3–5), 306–312. <https://doi.org/10.1159/000111349>

Magnani, P., Varghese Cherian, P., Gould, G. W., Greene, D. A., Sima, A. A. F., & Brosius, F. C. (1996). Glucose transporters in rat peripheral nerve: Paranodal expression of GLUT1 and GLUT3. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 45(12), 1466–1473. [https://doi.org/10.1016/S0026-0495\(96\)90174-2](https://doi.org/10.1016/S0026-0495(96)90174-2)

Marques, M. A. M., Berrêdo-Pinho, M., Rosa, T. L. S. A., Pujari, V., Lemes, R. M. R., Lery, L. M. S., Silva, C. A. M., Guimarães, A. C. R., Atella, G. C., Wheat, W. H., Brennan, P. J., Crick, D. C., Belisle, J. T., & Pessolani, M. C. V. (2015). 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*, 197(23), 3698–3707. <https://doi.org/10.1128/JB.00625-15>

Martinez, Alejandra N., Britto, C. F. P. C., Nery, J. A. C., Sampaio, E. P., Jardim, M. R., Sarno, E. N., & Moraes, M. O. (2006). Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of Mycobacterium leprae DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3154–3159. <https://doi.org/10.1128/JCM.02250-05>

Martinez, Alejandra Nóbrega, Ribeiro-Alves, M., Sarno, E. N., & Moraes, M. O. (2011). Evaluation of qPCR-Based assays for leprosy diagnosis directly in clinical specimens. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 5(10), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001354>

Masland, R. H. (2004). Neuronal cell types. *Current Biology*, 14(13), R497–R500. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.06.035>

Mattos KA, Oliveira VC, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LC, Melo RC, Acosta CC, Moura DF, Olmo R, Han J, Rosa PS, Almeida PE, Finlay BB, Borchers CH, Sarno EN, Bozza PT, Atella GC, Pessolani MC. Mycobacterium leprae intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol.* 2014 Jun;16(6):797-815. doi: 10.1111/cmi.12279. Epub 2014 Mar 21. PMID: 24552180; PMCID: PMC4262048.

Medeiros, R. C. A., Girardi, K. do C. de V., Cardoso, F. K. L., Mietto, B. de S., Pinto, T. G. de T., Gomez, L. S., Rodrigues, L. S., Gandini, M., Amaral, J. J., Antunes, S. L. G., Corte-Real, S., Rosa, P. S., Pessolani, M. C. V., Nery, J. A. da C., Sarno, E. N., Batista-Silva, L. R., Sola-Penna, M., Oliveira, M. F., Moraes, M. O., & Lara, F. A. (2016). Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by Mycobacterium leprae. *Journal of Biological Chemistry*, 291(41), 21375–21387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725283>

Miller, A. D., & Zachary, J. F. (2020). *Nervous System. January.*

Ministério da Saúde. (2010). *Guia de procedimentos técnicos Baciloscopia em Hanseníase.*

Ministério da Saúde. (2017). *Guia prático sobre a Hanseníase.* www.saude.gov.br/bvs

Ministério da Saúde. (2020). Boletim epidemiológico- Hanseníase 2020. *Ministério Da Saúde. Secretaria de Vigilância Em Saúde., Número Esp.*

Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol.* 1994 Jun;102(6):828-32. doi: 10.1111/1523-1747.ep12381958.

Nave, K. A., & Salzer, J. L. (2006). Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Current Opinion in Neurobiology*, 16(5), 492–500. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2006.08.008>

Neal, J. M., Gerancher, J. C., Hebl, J. R., Ilfeld, B. M., McCartney, C. J. L., Franco, C. D., & Hogan, Q. H. (2009). Upper Extremity Regional Anesthesia. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*, 34(2), 134–170. <https://doi.org/10.1097/AAP.0b013e31819624eb>

Nelson, A. D., & Jenkins, P. M. (2017). Axonal membranes and their domains: Assembly and function of the axon initial segment and node of Ranvier. *Frontiers in*

Cellular Neuroscience, 11(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00136>

Pandey, A. K., & Sasseti, C. M. (2008). Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(11), 4376–4380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711159105>

Pandhi, D., & Chhabra, N. (2013). New insights in the pathogenesis of type 1 and type 2 lepra reaction. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology*, 79(6), 739–749. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.120719>

Park, A. J., Rendini, T., Martiniuk, F., & Levis, W. R. (2016). Leprosy as a model to understand cancer immunosurveillance and T cell anergy. *Journal of Leukocyte Biology*, 100(1), 47–54. <https://doi.org/10.1189/jlb.5ru1215-537r>

Peiró, C., Romacho, T., Azcutia, V., Villalobos, L., Fernández, E., Bolaños, J. P., Moncada, S., & Sánchez-Ferrer, C. F. (2016). Inflammation, glucose, and vascular cell damage: The role of the pentose phosphate pathway. *Cardiovascular Diabetology*, 15(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s12933-016-0397-2>

Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJA, et al. Innate Immune Responses in Leprosy. *Front Immunol*. 2018;9:518. Published 2018 Mar 28. doi:10.3389/fimmu.2018.00518

Pellerin, L., Stolz, M., Sorg, O., Martin, J. L., Deschepper, C. F., & Magistretti, P. J. (1997). Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line. *Glia*, 21(1), 74–83. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(199709\)21:1<74::AID-GLIA8>3.0.CO;2-1](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1136(199709)21:1<74::AID-GLIA8>3.0.CO;2-1)

Poduslo, J. F., Curran, G. L., & Berg, C. T. (1994). Macromolecular permeability across the blood-nerve and blood-brain barriers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(12), 5705–5709. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5705>

Poitelon, Y., Kopec, A. M., & Belin, S. (2020). Myelin Fat Facts: An Overview of Lipids and Fatty Acid Metabolism. *Cells*, 9(4), 812. <https://doi.org/10.3390/cells9040812>

Previtali, S. C., Nodari, A., Taveggia, C., Pardini, C., Dina, G., Villa, A., Wrabetz, L., Quattrini, A., & Feltri, M. L. (2003). Expression of laminin receptors in Schwann cell differentiation: Evidence for distinct roles. *Journal of Neuroscience*, 23(13), 5520–5530. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.23-13-05520.2003>

- Proia, P., Di Liegro, C., Schiera, G., Fricano, A., & Di Liegro, I. (2016). Lactate as a Metabolite and a Regulator in the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1450. <https://doi.org/10.3390/ijms17091450>
- Rambukkana A., Salzer J. L., Yurchenco P. D. & Tuomanen E. I. Neural Targeting of *Mycobacterium leprae* Mediated by the G Domain of the Laminin- α 2 Chain. *Cell* 88, 811–821 (1997). pmid:9118224
- Rasband, M. N., & Macklin, W. B. (2012). Myelin Structure and Biochemistry. *Basic Neurochemistry*, 180–199. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00010-9>
- Rasband, M. N., & Peles, E. (2016). The nodes of Ranvier: Molecular assembly and maintenance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(3), 1–15. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a020495>
- Rees, R. J. W., & McDougall, A. C. (1977). Airborne infection with *Mycobacterium leprae* in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 10(1), 63–68. <https://doi.org/10.1099/00222615-10-1-63>
- Richner, M., Ferreira, N., Dudele, A., Jensen, T. S., Vaegter, C. B., & Gonçalves, N. P. (2019). Functional and structural changes of the blood-nerve-barrier in diabetic neuropathy. *Frontiers in Neuroscience*, 13(JAN), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.01038>
- Rose J, Brian C, Woods J, Pappa A, Panayiotidis MI, Powers R, Franco R. Mitochondrial dysfunction in glial cells: Implications for neuronal homeostasis and survival. *Toxicology*. 2017 Nov 1;391:109-115. doi: 10.1016/j.tox.2017.06.011. Epub 2017 Jun 26. PMID: 28655545; PMCID: PMC5681369.
- Rumora AE, Lentz SI, Hinder LM, Jackson SW, Valesano A, Levinson GE, Feldman EL. Dyslipidemia impairs mitochondrial trafficking and function in sensory neurons. *FASEB J*. 2018 Jan;32(1):195-207. doi: 10.1096/fj.201700206R. Epub 2017 Sep 13. PMID: 28904018; PMCID: PMC6191072.
- Saito, A., & Cavalli, V. (2016). Signaling over distances. *Molecular and Cellular Proteomics*, 15(2), 382–393. <https://doi.org/10.1074/mcp.R115.052753>
- Saito, F., Masaki, T., Kamakura, K., Anderson, L. V. B., Fujita, S., Fukuta-Ohi, H.,

- Sunada, Y., Shimizu, T., & Matsumura, K. (1999). Characterization of the transmembrane molecular architecture of the dystroglycan complex in Schwann cells. *Journal of Biological Chemistry*, 274(12), 8240–8246. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8240>
- Salzer, J. L., Brophy, P. J., & Peles, E. (2008). Molecular domains of myelinated axons in the peripheral nervous system. *Glia*, 56(14), 1532–1540. <https://doi.org/10.1002/glia.20750>
- Samara, C., Poirot, O., Domènech-Estévez, E., & Chrast, R. (2013). Neuronal activity in the hub of extrasynaptic Schwann cell-axon interactions. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7(NOV), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fncel.2013.00228>
- Schilling, A. K., Del-Pozo, J., Lurz, P. W. W., Stevenson, K., Avanzi, C., Shuttleworth, C. M., Cole, S. T., & Meredith, A. L. (2019). Leprosy in red squirrels in the UK. *Veterinary Record*, 184(13), 416. <https://doi.org/10.1136/vr.l1385>
- Scollard, D. M., Adams, L. B., Gillis, T. P., Krahenbuhl, J. L., Truman, R. W., & Williams, D. L. (2006). The continuing challenges of leprosy. In *Clinical Microbiology Reviews*.
- Scollard, D. M., Smith, T., Bhoopat, L., Theetranont, C., Rangdaeng, S., & Morens, D. M. (1994). Epidemiologic characteristics of leprosy reactions. *International Journal of Leprosy*, 62(4), 559–567.
- Scollard, David M., Truman, R. W., & Ebenezer, G. J. (2015). Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clinics in Dermatology*, 33(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/J.CLINDERMATOL.2014.07.008>
- Serrano-Coll, H., Salazar-Peláez, L., Acevedo-Saenz, L., & Cardona-Castro, N. (2018). Mycobacterium leprae-induced nerve damage: direct and indirect mechanisms. *Pathogens and Disease*, 76(6). <https://doi.org/10.1093/femspd/fty062>
- Shimizu, F., Sano, Y., Abe, M. aki, Maeda, T., Ohtsuki, S., Terasaki, T., & Kanda, T. (2011). Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *Journal of Cellular Physiology*, 226(1), 255–266. <https://doi.org/10.1002/jcp.22337>
- Silva, C. A. M., Danelishvili, L., McNamara, M., Berredo-Pinho, M., Bildfell, R., Biet, F., Rodrigues, L. S., Oliveira, A. V., Bermudez, L. E., & Pessolani, M. C. V. (2013). Interaction of Mycobacterium leprae with human airway epithelial cells: Adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by surface proteome analysis.

Infection and Immunity, 81(7), 2645–2659. <https://doi.org/10.1128/IAI.00147-13>

Sonveaux, P., Végran, F., Schroeder, T., Wergin, M. C., Verrax, J., Rabbani, Z. N., De Saedeleer, C. J., Kennedy, K. M., Diepart, C., Jordan, B. F., Kelley, M. J., Gallez, B., Wahl, M. L., Feron, O., & Dewhirst, M. W. (2008). Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 118(12), 3930–3942. <https://doi.org/10.1172/JCI36843>

Stewart, J. D. (2003). Peripheral nerve fascicles: Anatomy and clinical relevance. *Muscle and Nerve*, 28(5), 525–541. <https://doi.org/10.1002/mus.10454>

Stiefel P, Schmidt-Emrich S, Maniura-Weber K, Ren Q. Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide. *BMC Microbiol.* 2015 Feb 18;15:36. doi: 10.1186/s12866-015-0376-x. PMID: 25881030; PMCID: PMC4337318.

Stincone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, 90(3), 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>

Swift, T. R., & Sabin, T. D. (1998). Neurological manifestations of leprosy. *Neurologist*, 4(1), 21–30. <https://doi.org/10.1097/00127893-199801000-00004>

Śliwka L, Wiktorska K, Suchocki P, Milczarek M, Mielczarek S, Lubelska K, Cierpiat T, Łyżwa P, Kielbasiński P, Jaromin A, Flis A, Chilmonczyk Z. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. *PLoS One.* 2016 May 19;11(5):e0155772. doi: 10.1371/journal.pone.0155772. PMID: 27196402; PMCID: PMC4873276.

Tamara, & Anderson, K. V. (2003). Patterning cell types in the dorsal spinal cord: What the mouse mutants say. *Nature Reviews Neuroscience*, 4(4), 290–298. <https://doi.org/10.1038/nrn1073>

Tapinos, N., Ohnishi, M., & Rambukkana, A. (2006). ErbB2 receptor tyrosine kinase signaling mediates early demyelination induced by leprosy bacilli. *Nature Medicine*. <https://doi.org/10.1038/nm1433>

Tapinos, N., & Rambukkana, A. (2005). Insights into regulation of human Schwann cell proliferation by Erk1/2 via a MEK-independent and p56Lck-dependent pathway from

- leprosy bacilli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(26), 9188–9193. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501196102>
- Truman, R. W., and J. L. Krahenbuhl. 2001. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 69:1–12.
- Vallochi AL, Teixeira L, Oliveira KDS, Maya-Monteiro CM, Bozza PT. Lipid Droplet, a Key Player in Host-Parasite Interactions. *Front Immunol.* 2018;9:1022. Published 2018 May 23. doi:10.3389/fimmu.2018.01022
- Van der Vusse GJ. Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2009;24(4):300-7. doi: 10.2133/dmpk.24.300. PMID: 19745557
- Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C., & Thompson, C. B. (2009). Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science*, 324(5930), 1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
- Vashisht D, Das AL, Vaishampayan SS, Vashisht S, Joshi R. Nerve conduction studies in early tuberculoid leprosy. *Indian Dermatol Online J.* 2014;5(Suppl 2):S71-S75. doi:10.4103/2229-5178.146164
- Verderio, C., Bianco, F., Blanchard, M. P., Bergami, M., Canossa, M., Scarfone, E., & Matteoli, M. (2006). Cross talk between vestibular neurons and Schwann cells mediates BDNF release and neuronal regeneration. *Brain Cell Biology.* <https://doi.org/10.1007/s11068-007-9011-6>
- Viader, A., Sasaki, Y., Kim, S., Strickland, A., Workman, C. S., Yang, K., Gross, R. W., & Milbrandt, J. (2013). Aberrant Schwann Cell Lipid Metabolism Linked to Mitochondrial Deficits Leads to Axon Degeneration and Neuropathy. *Neuron*, 77(5), 886–898. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.01.012>
- Vissa, V. D., & Brennan, P. J. (2001). The genome of *Mycobacterium leprae*: A minimal mycobacterial gene set. *Genome Biology*, 2(8), 1–8. <https://doi.org/10.1186/gb-2001-2-8-reviews1023>
- Vural, A., Doppler, K., & Meinl, E. (2018). Autoantibodies against the node of ranvier in seropositive chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: Diagnostic, pathogenic, and therapeutic relevance. *Frontiers in Immunology*, 9(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01029>
- Wilder-Smith, E. P., & Van Brakel, W. H. (2008). Nerve damage in leprosy and its

management. *Nature Clinical Practice Neurology*, 4(12), 656–663.
<https://doi.org/10.1038/ncpneuro0941>

Wilder-Smith, E. P. V., Wilder-Smith, A. J., & Nirikko, A. C. (2000). Skin and muscle vasomotor reflexes in detecting autonomic dysfunction in leprosy. *Muscle & Nerve*, 23(7), 1105–1112. [https://doi.org/10.1002/1097-4598\(200007\)23:7<1105::AID-MUS14>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-4598(200007)23:7<1105::AID-MUS14>3.0.CO;2-A)

Willem, M., Garratt, A. N., Novak, B., Citron, M., Kaufmann, S., Rittger, A., DeStrooper, B., Saftig, P., Birchmeier, C., & Haass, C. (2006). Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science*, 314(5799), 664–666.
<https://doi.org/10.1126/science.1132341>

Woodhoo, A., Alonso, M. B. D., Droggiti, A., Turmaine, M., D'Antonio, M., Parkinson, D. B., Wilton, D. K., Al-Shawi, R., Simons, P., Shen, J., Guillemot, F., Radtke, F., Meijer, D., Feltri, M. L., Wrabetz, L., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2009). Notch controls embryonic Schwann cell differentiation, postnatal myelination and adult plasticity. *Nature Neuroscience*, 12(7), 839–847. <https://doi.org/10.1038/nn.2323>

World Health Organization. (2019). Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy free world. *Weekly Epidemiological Record*, 35/36(94), 389–412.
[https://doi.org/94\(35/36\),389-411](https://doi.org/94(35/36),389-411)

Yagihashi, S., Mizukami, H., & Sugimoto, K. (2011). Mechanism of diabetic neuropathy: Where are we now and where to go? *Journal of Diabetes Investigation*, 2(1), 18–32. <https://doi.org/10.1111/j.2040-1124.2010.00070.x>

Yang, D., Shui, T., Miranda, J. W., Gilson, D. J., Song, Z., Chen, J., Shi, C., Zhu, J., Yang, J., & Jing, Z. (2016). Mycobacterium leprae-Infected Macrophages Preferentially Primed Regulatory T Cell Responses and Was Associated with Lepromatous Leprosy. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 10(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004335>

Yu, L., Chen, X., Wang, L., & Chen, S. (2016). The sweet trap in tumors: Aerobic glycolysis and potential targets for therapy. *Oncotarget*, 7(25), 38908–38926.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.7676>

Zeisel, A., Hochgerner, H., Lönnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., van der Zwan, J., Häring, M., Braun, E., Borm, L. E., La Manno, G., Codeluppi, S., Furlan, A., Lee, K., Skene, N., Harris, K. D., Hjerling-Leffler, J., Arenas, E., Ernfors, P., Marklund, U., &

Linnarsson, S. (2018). Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell*, 174(4), 999-1014.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.06.021>

Zilic, L., Garner, P. E., Yu, T., Roman, S., Haycock, J. W., & Wilshaw, S. P. (2015). An anatomical study of porcine peripheral nerve and its potential use in nerve tissue engineering. *Journal of Anatomy*, 227(3), 302–314. <https://doi.org/10.1111/joa.12341>



Intracellular *Mycobacterium leprae* Utilizes Host Glucose as a Carbon Source in Schwann Cells

Khushboo Borah,^a Karina do Carmo de Vasconcelos Girardi,^b Tom A. Mendum,^a Leticia Miranda Santos Lery,^b Dany J. V. Beste,^a Flavio Alves Lara,^b Maria Cristina Vidal Pessolani,^b Johnjoe McFadden^a

^aFaculty of Health and Medical Sciences, University of Surrey, Guildford, United Kingdom

^bLaboratório de Microbiologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ABSTRACT New approaches are needed to control leprosy, but understanding of the biology of the causative agent *Mycobacterium leprae* remains rudimentary, principally because the pathogen cannot be grown in axenic culture. Here, we applied ¹³C isotopomer analysis to measure carbon metabolism of *M. leprae* in its primary host cell, the Schwann cell. We compared the results of this analysis with those of a related pathogen, *Mycobacterium tuberculosis*, growing in its primary host cell, the macrophage. Using ¹³C isotopomer analysis with glucose as the tracer, we show that whereas *M. tuberculosis* imports most of its amino acids directly from the host macrophage, *M. leprae* utilizes host glucose pools as the carbon source to biosynthesize the majority of its amino acids. Our analysis highlights the anaplerotic enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase required for this intracellular diet of *M. leprae*, identifying this enzyme as a potential antileprosy drug target.

IMPORTANCE Leprosy remains a major problem in the world today, particularly affecting the poorest and most disadvantaged sections of society in the least developed countries of the world. The long-term aim of research is to develop new treatments and vaccines, and these aims are currently hampered by our inability to grow the pathogen in axenic culture. In this study, we probed the metabolism of *M. leprae* while it is surviving and replicating inside its primary host cell, the Schwann cell, and compared it to a related pathogen, *M. tuberculosis*, replicating in macrophages. Our analysis revealed that unlike *M. tuberculosis*, *M. leprae* utilized host glucose as a carbon source and that it biosynthesized its own amino acids, rather than importing them from its host cell. We demonstrated that the enzyme phosphoenolpyruvate carboxylase plays a crucial role in glucose catabolism in *M. leprae*. Our findings provide the first metabolic signature of *M. leprae* in the host Schwann cell and identify novel avenues for the development of antileprosy drugs.

KEYWORDS *Mycobacterium leprae*, Schwann cells, glucose, *Mycobacterium tuberculosis*, macrophage, phosphoenolpyruvate carboxylase, carbon metabolism

Leprosy is an ancient infectious disease that remains a major cause of chronic morbidity in vulnerable populations in developing countries, despite the availability of effective, though very lengthy, treatment (1, 2). Victims continue to be stigmatized such that the disease has recently been described as “the world’s oldest human-rights issue” (3). New approaches are needed to control the disease, such as effective vaccines and shorter treatment regimens (2, 4, 5). Research into leprosy, however, is severely hampered by our inability to grow the causative agent, *Mycobacterium leprae*, in axenic culture (6). Genome sequencing revealed that the *M. leprae* genome is drastically reduced compared to the *Mycobacterium tuberculosis* genome (7), suggesting that the organism’s obligate intracellular lifestyle has driven the loss of genes that are dispensable in its human host, and potentially rendering its replication dependent on nutrients

Citation Borah K, Girardi KDCDV, Mendum TA, Lery LMS, Beste DJV, Lara FA, Pessolani MCV, McFadden J. 2019. Intracellular *Mycobacterium leprae* utilizes host glucose as a carbon source in Schwann cells. *mBio* 10:e02351-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02351-19>.

Editor Jon P. Boyle, University of Pittsburgh

Copyright © 2019 Borah et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Address correspondence to Johnjoe McFadden, j.mcfadden@surrey.ac.uk.

Received 23 September 2019

Accepted 11 November 2019

Published 17 December 2019

available only *in vivo*. However, despite this genomic downsizing, its essential central metabolic pathways appear to remain intact and as competent as those of *M. tuberculosis*, so why *M. leprae* fails to grow *in vitro* remains a puzzle. Also, there remains a major question about the intracellular nutrient sources utilized by *M. leprae* growing inside its human host cell. It is increasingly recognized that metabolism plays a key role in the survival and virulence of intracellular pathogens (8–11). Carbon metabolism has been extensively investigated in *M. tuberculosis* both *in vitro* (9, 10) and *ex vivo* (8, 11) as a route toward identification of novel drug targets. It has been shown that *M. tuberculosis* accesses multiple carbon sources, including lipids and cholesterol, when replicating inside its host macrophage cell (8, 10, 11). For intracellular *M. leprae*, impairment of host cell cholesterol metabolism decreases its survival, but cholesterol was not utilized as either an energy or carbon source by the bacilli (12–17). This is consistent with *in silico* studies that demonstrated that *M. leprae* has lost many genes for cholesterol catabolism, including the Mce4 operon, which codes for a sterol lipid transport system found in other mycobacteria, including *M. tuberculosis* (12). Fatty acids have also been suggested as potential carbon sources, as palmitic acid is oxidized by *M. leprae* (18, 19). Infection by *M. leprae* increases glucose uptake in Schwann cells (20), yet whether this relates to the uptake of glucose as a carbon source by *M. leprae* is unknown.

Here, ^{13}C isotopomer analysis was used to study the metabolic interactions between *M. leprae* and Schwann cells, and these results were compared to the profile of *M. tuberculosis* replicating within human macrophages. Our analysis shows major differences in the metabolic adaptations of these two pathogens in their respective intracellular environment.

Assimilation of [$^{13}\text{C}_6$]glucose by host and pathogen. Previous studies showed that infection with *M. leprae* boosted the glucose uptake rate of Schwann cells, suggesting that this sugar is a potential carbon source for the pathogen (20). To test this hypothesis, Schwann cells were infected with *M. leprae* in the presence of [$^{13}\text{C}_6$]glucose. We used a multiplicity of infection (MOI) of 100:1 in order to obtain approximately 83% of Schwann cells infected with *M. leprae* (14). Infected cells were then incubated in [$^{13}\text{C}_6$]glucose-containing tissue culture media, before they were harvested, lysed, and separated into eukaryotic and bacterial fractions using our previously established methods (8). To directly compare results to the intracellular metabolism of *M. tuberculosis*, we performed the same postinfection [$^{13}\text{C}_6$]glucose labeling experiments with the THP-1 macrophage-*M. tuberculosis* model, which served as a control for our *M. leprae*-Schwann cell model (8). Control experiments were performed using uninfected mammalian cells (Schwann or macrophages) and bacteria (*M. tuberculosis* or *M. leprae*) incubated in RPMI 1640 medium containing [$^{13}\text{C}_6$]glucose. Cells were lysed, and ^{13}C enrichment (^{13}C incorporated from the tracer) and isotopomer distribution of amino acids were measured in eukaryotic and bacterial fractions by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) (21, 22) (Fig. 1; see also Data Set S1 in the supplemental material). As an additional check, we also performed a prelabeling experiment, in which Schwann cells were passaged three times in [$^{13}\text{C}_6$]glucose-containing medium prior to infection with *M. leprae*, followed by recovery and ^{13}C analysis of host and bacterial amino acids. However, by using this experimental approach, we found significantly lower levels of ^{13}C incorporation with only a few amino acids labeled in *M. leprae*. This was probably because of dilution of label in prelabeled Schwann cells (see Fig. S1, panel i.a in the supplemental material). The comparison of ^{13}C profiles in the detected amino acids of *M. leprae* from the prelabeling experiment were identical to those derived from postinfection pulsed Schwann cells (Fig. S1, panel ii). This confirms that the labeling profiles from pulsed experiments were not biased by the experimental approach used in this study.

To validate our results, it was first necessary to demonstrate that the fractionation protocol successfully separated host and bacterial cells. This was confirmed by the demonstration that intracellular *M. leprae* and infected Schwann cell fractions had

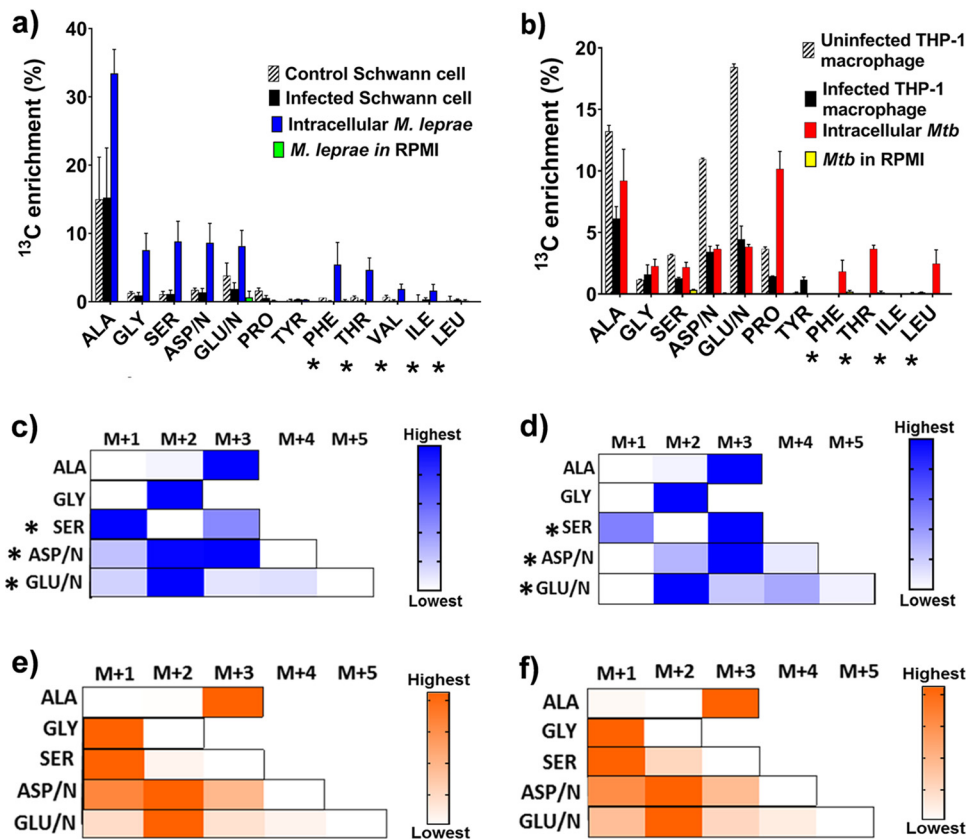


FIG 1 Assimilation of [¹³C]₆glucose by pathogens and host cells. (a and b) Average ¹³C enrichments are compared between uninfected Schwann cells, *M. leprae*-infected Schwann cells, intracellular *M. leprae*, and *M. leprae* in RPMI 1640 medium (control) (a) and uninfected THP-1 macrophage, *M. tuberculosis*-infected THP-1 macrophages, intracellular *M. tuberculosis* (*Mtb*), and *Mtb* in RPMI 1640 medium (control) (b). (c to f) ¹³C isotopomer profiles are shown in *M. leprae*-infected Schwann cells (c), intracellular *M. leprae* (d), *M. tuberculosis*-infected THP-1 macrophages (e), and intracellular *M. tuberculosis* (f). Measurements are shown as heat maps with a single gradient to highlight the proportional abundances of isotopomers for an amino acid. M+1, M+2, M+3, M+4, and M+5 are the isotopomer families with different numbers of labeled carbons. Significant differences in the profiles between *M. leprae* and infected Schwann cells are indicated by an asterisk. The relative abundances of each isotopomer (see Data Sets S2 and S3 in the supplemental material) are indicated by a color gradient. Amino acids and *m/z* values are as follows: alanine (ALA), *m/z* 260; glycine (GLY), *m/z* 246; serine (SER), *m/z* 390; aspartate/asparagine (ASP/ASN [ASP/N]), *m/z* 418; glutamate/glutamine (GLU/GLN [GLU/N]), *m/z* 432; phenylalanine (PHE), *m/z* 336; threonine (THR), *m/z* 404; valine (VAL), *m/z* 288; proline (PRO), *m/z* 258; isoleucine (ILE), *m/z* 274; and tyrosine (TYR), *m/z* 466. Amino acids not shown in the panels had no detectable ¹³C. Essential amino acids in Schwann cells (a) and THP-1 macrophages (b) are marked with an asterisk. Measurements are averages plus standard deviations (SD) (error bars) from three independent infection experiments and are included in Data Sets S2 and S3.

different ¹³C enrichment of amino acids (Fig. 1a). Significantly, there was no ¹³C label incorporated the essential amino acids of Schwann cells, such as phenylalanine (Phe), threonine (Thr), valine (Val), and isoleucine (Ile), but label was incorporated into these amino acids derived from the bacterial fraction, confirming the separation of Schwann cell and *M. leprae* compartments. This finding also demonstrated that intracellular *M. leprae* bacilli are metabolically active and synthesizing new protein (Fig. 1a and Data Set S1). In contrast, there was very little ¹³C incorporation when *M. leprae* was incubated in RPMI 1640 medium, consistent with the lack of axenic growth (Fig. 1a). These control experiments also confirmed that the incorporation of label into *M. leprae* is taking place within its host cell, rather than in the RPMI 1640 tissue culture medium, confirming that the intracellular results represented the metabolism of *M. leprae* within its host cell, rather than being an artifact of being in a pool of RPMI 1640 medium. For *M. tuberculosis*-infected THP-1 macrophages, we observed a similar pattern of segregation of ¹³C assimilation as previously described (8) with no enrichment in the essential amino acids of the host cell fractions, but the same amino acids were labeled in the *M. tuberculosis*'s fraction (Fig. 1b).

The incorporation of ^{13}C from [$^{13}\text{C}_6$]glucose into *M. leprae* amino acids demonstrates that the leprosy bacillus has access to glucose-derived carbon from the host cell. The majority of the amino acids showed $<10\%$ ^{13}C enrichment. This is likely to be a reflection of the slow dynamics of replacement of unlabeled amino acid pools synthesized before incubation with labeled glucose. It may also reflect utilization of additional unlabeled carbon sources. However, considering only the ^{13}C enrichment data, it is not possible to distinguish whether glucose or some product of glucose catabolism (such as pyruvate) is imported from the host cell. To gain further insights into the precise nature of the source of carbon, we first needed to ascertain which amino acids were imported directly from the host cell and which were biosynthesized by *M. leprae* and thereby function as reporters of *M. leprae* metabolism. We compared the ^{13}C mass isotopomer distribution (the pattern and proportion of $^{12}\text{C}/^{13}\text{C}$ in the carbon backbone) of five amino acids that had significant ($>1\%$) ^{13}C enrichment in both hosts and the pathogens. The profiles of three *M. leprae* amino acids, serine (Ser), aspartate/asparagine (Asp/Asn), and glutamate/glutamine (Glu/Gln), were significantly different from the same amino acids from the infected Schwann cell (Fig. 1c and d), indicating that these amino acids are biosynthesized by the pathogen rather than imported from the host.

Of the labeled *M. leprae* amino acids, only alanine (Ala) and glycine (Gly) had similar isotopomer profiles in *M. leprae* and in Schwann cells, suggesting that these amino acids could be acquired by *M. leprae* directly from the host cell (Fig. 1c and d). In contrast, the profiles of all five of these amino acids from intracellular *M. tuberculosis* were indistinguishable from the same amino acids in its host THP-1 macrophage (Fig. 1e and f), indicating that, as previously described (8), *M. tuberculosis* imports these amino acids from its host cell and directly incorporates them into biomass. Our finding that *M. leprae* amino acids are biosynthesized rather than imported is consistent with previous proteomic analyses, which showed that enzymes required for biosynthesis of several amino acids such as Asp/Asn, Ala, Thr, cysteine, proline (Pro), lysine, histidine, leucine, Ile, and Val are synthesized by intracellular *M. leprae* (23).

***M. leprae* utilized host glucose pools to biosynthesize amino acids.** Since amino acids are synthesized from precursors in central metabolism, the isotopomer profile of biosynthesized (rather than imported) amino acids is a reporter of *M. leprae*'s central carbon metabolism. For amino acids such as Val, Gly, and Ser that are synthesized from precursors in the glycolytic arm of metabolism, all carbon atoms were ^{13}C labeled in intracellular *M. leprae*, indicating that the entire $^{13}\text{C}_6$ backbone of the labeled glucose was delivered intact to their precursor (Fig. 2 and Fig. S2). This was in contrast to the pattern for *M. tuberculosis*, in which only Ala was fully labeled, whereas Val, Ser, and Gly had fewer labeled carbon atoms, indicating considerable carbon shuffling between the carbon backbone of labeled glucose and their precursor. The labeling pattern for Phe, which is synthesized from both the glycolytic and pentose phosphate pathway (PPP) arms of the metabolic network, was also very different between *M. leprae* and *M. tuberculosis*. In particular, the highest ^{13}C isotopomer for Phe in *M. leprae* was M+6 (six carbon atoms are ^{13}C labeled), indicating that the pathogen incorporates the entire carbon backbone of glucose into its biosynthesis (Fig. 2 and Fig. S2). In contrast, Phe in *M. tuberculosis* was characterized by a range of isotopomers with a notable absence of M+6, consistent with considerable carbon shuffling between labeled glucose and the amino acid's precursors and consistent with previous studies that indicate that pathogen imports carbon substrates, other than glucose, such as lipids, from its host cell (8, 10, 11, 24).

The amino acids derived from the tricarboxylic acid cycle (TCA) cycle, including Asp/Asn, Thr, and Ile, also showed very different profiles between *M. leprae* and *M. tuberculosis* (Fig. 2 and Fig. S2). For *M. tuberculosis*, the predominant isotopomers were M+1 and M+2, consistent with our previous studies indicating that the intracellular pathogen utilizes carbon sources, such as host-derived lipids (rather than glucose), which are catabolized through the oxidative TCA cycle (8, 9). A recent work by Serafini

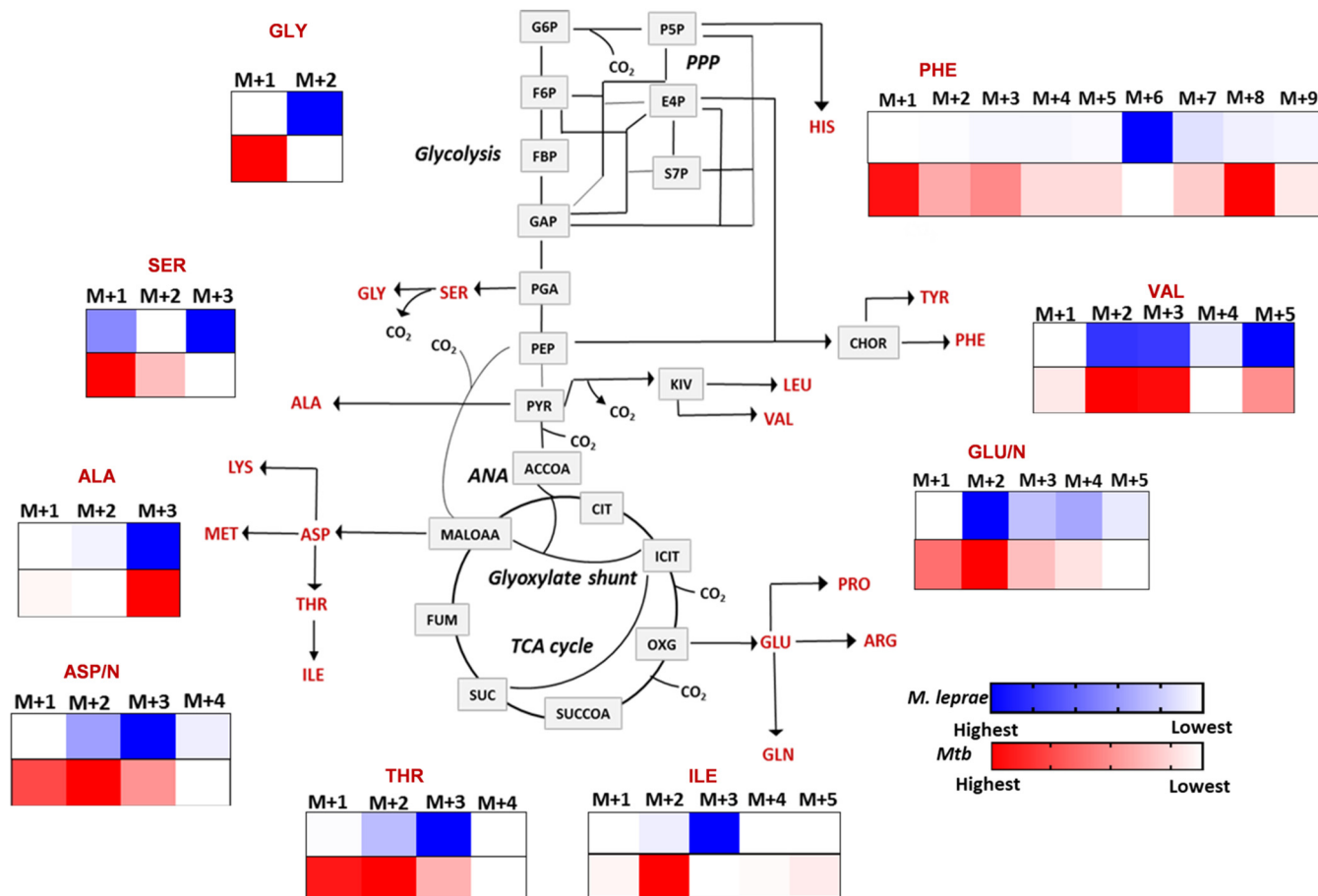


FIG 2 ¹³C isotopomer profiles of amino acids in intracellular *M. leprae* versus *M. tuberculosis* (*Mtb*). (A) Amino acid profiles are plotted on a metabolic map showing the reactions for the TCA cycle, glycolysis, PPP, and anaplerotic pathway (ANA). M+1, M+2, M+3, M+4, M+5, M+6, M+7, M+8, and M+9 are the mass isotopomer families. Proportional increases or decreases in the ¹³C abundance of mass isotopomers of a metabolite are indicated by a single gradient. The isotopomer family occupying the highest proportion of ¹³C is shown with the highest color intensity. The metabolites are malate oxaloacetate (MALOAA), fumarate (FUM), succinate (SUC), succinyl coenzyme A (SUCCOA), 2-oxoglutarate (OXG), isocitrate (ICIT), citrate (CIT), acetyl coenzyme A (ACCOA), pyruvate (PYR), phosphoglyceric acid (PGA), glyceraldehyde-3-phosphate (GAP), fructose-6-bisphosphate (FBP), fructose-6-phosphate (F6P), glucose-6-phosphate (G6P), pentose-5-phosphate (P5P), erythrose-4-phosphate (E4P), sedoheptulose-7-phosphate (S7P), ketoisovalerate (KIV), chorismate (CHOR), histidine (HIS), glutamine (GLN), glutamic acid (GLU), lysine (LYS), methionine (MET), and arginine (ARG). Measurements for *M. leprae* and *M. tuberculosis* are averages ± SD from three independent infection experiments (Data Sets S1 and S2). Statistically significant changes (*P* < 0.05) between the quantitative proportions of *M. leprae* and *M. tuberculosis* obtained by Student's *t* test are indicated by an asterisk.

et al. (25) also demonstrated that *M. tuberculosis* utilized both lactate and pyruvate as carbon sources *in vitro*, suggesting that these terminal glycolytic intermediates could be carbon sources for *M. tuberculosis* during infection. In contrast, the predominant isotopomer for these amino acids in *M. leprae* was M+3, suggesting that the carbon backbone of their precursor, oxaloacetate, is derived from glucose via anaplerotic carboxylation of phosphoenolpyruvate (PEP) by phosphoenolpyruvate carboxylase (7). The ¹³C isotopomer profile for Asp/Asn from prelabeling experiments was also similar, demonstrating identical pattern of glucose utilization via phosphoenolpyruvate carboxylase in both experiments (Fig. S1, panel ii).

Infection induces metabolic perturbations in the host cell. We compared the ¹³C isotopomer profiles of amino acids in uninfected (control) and infected Schwann cells and THP-1 macrophages (Fig. S3a to g). There were no significant alterations in the profiles of Ala, Gly, Ser, Asp/Asn, Glu/Gln, and Pro in infected Schwann cells, suggesting that there were no changes in host cell carbon flux through glycolysis and the TCA cycle (Fig. S3, panels a.i, b.i, c.i, d.i, e.i, and f.i) as a result of infection. This was in contrast to *M. tuberculosis*-infected THP-1 macrophages, which demonstrated differences in the metabolic profiles of Gly, Ser, Asp/Asn, Glu/Gln, and Pro amino acids that are derived

from glycolysis and the TCA cycle (Fig. S3, panels b.ii, c.ii, d.ii, e.ii, and f.ii), suggesting major shifts in carbon flux through these host cell pathways upon *M. tuberculosis* infection. Host cell metabolism was not, however, entirely unperturbed by *M. leprae* infection. The isotopomer profile of tyrosine (Tyr) was different between uninfected and infected Schwann cells (Fig. S3, panel g.i). The carbon backbone of Tyr is derived from chorismate which is synthesized by the combination of carbons from erythrose-4-phosphate and two molecules of PEP that enter the PPP. The data suggest that *M. leprae* infection stimulates increased carbon flux into the PPP in Schwann cells. These findings are consistent with previous evidence of increased glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, a key enzyme of the oxidative PPP, in infected Schwann cells (20). *M. tuberculosis* infection of macrophages also induced significant changes in the isotopomer profile of Tyr, indicating that infection with *M. tuberculosis* induced a similar increased routing of carbon flux through the PPP of host cells (Fig. S3, panel g.ii).

In summary, we demonstrated that the intracellular metabolism of *M. leprae* differs from that of *M. tuberculosis*. Unlike *M. tuberculosis*, *M. leprae* accesses host cell glucose pools as carbon sources and uses the anaplerotic pathway for the synthesis of amino acids derived from the TCA cycle. The primary *M. leprae* host cell, the Schwann cell, is the most important glial cell involved in metabolism and function of the nervous system, and Schwann cells have access to glucose as the primary energy source in the nervous system (26). Our data suggest that *M. leprae* accesses host glucose pools and possibly the structural analogs of glucose, such as fructose or galactose, or even a glucose (or isomer) polymer, such as glycogen, which is available in Schwann cells, potentially explaining the lack of glucose incorporation in RPMI 1640 medium (27). Note also that these differences in intracellular metabolism between *M. leprae* and *M. tuberculosis* are not predictable by considering the gene repertoire of these related pathogens, as despite the genetic downsizing of *M. leprae*, both pathogens encode all the genes necessary for the central metabolic pathways. However, in contrast to *M. tuberculosis*'s complex anaplerotic node which is composed of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), malic enzyme (MEZ), pyruvate carboxylase (PCA), and pyruvate phosphate dikinase (PPDK), the *M. leprae* genome encodes only two anaplerotic enzymes linking glycolysis and the TCA cycle: PEP carboxylase (PPC) and PEPCK (Fig. 3) (28, 29). In other bacterial species where both enzymes are present, such as *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Corynebacterium glutamicum*, PEPCK is used primarily for gluconeogenesis, whereas PPC is employed for anaplerotic synthesis of oxaloacetate during glucose metabolism (30–32). Also, in *E. coli*, PEPCK failed to complement for the loss of PPC (30), suggesting that, in *M. leprae*, PPC plays an anaplerotic role. Our analysis thereby suggests that PPC is likely to be essential for the intracellular survival of *M. leprae*, and since it is absent in humans, it is a potential drug target for treatment of leprosy.

Experimental procedures. (i) Bacterial strains and growth. *M. leprae* Thai-53 strain of *M. leprae* was obtained from the Department of Biology at Lauro de Souza Lima Institute by Patricia Sammarco Rosa. Briefly, *M. leprae* was isolated from athymic *nu/nu* mouse footpads and then purified and counted at the Oswaldo Cruz Institute as described previously (33). For the experiments, *M. leprae* viability over 80% was measured by using a LIVE/DEAD bacterial viability kit (Life Technologies). *M. tuberculosis* H37Rv was cultivated on Middlebrook 7H11 agar and Middlebrook 7H9 broth supplemented with 5% (vol/vol) oleic acid-albumin-dextrose-catalase enrichment supplement (Becton Dickinson) and 0.5% (vol/vol) glycerol at 37°C with agitation (150 rpm).

(ii) Schwann cell culture and *M. leprae* infection. The human Schwann cell line ST88-14 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and the cell culture was maintained in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Cripion Biotechnology) in 5% CO₂ atmosphere at 37°C. For infection, 3 × 10⁶ Schwann cells were incubated using a multiplicity of infection (MOI) of 100 bacteria per cell (100:1) for 48 h at 33°C, the ideal temperature of *M. leprae* maintenance. After 48 h of the infection, the medium was changed to 30 ml RPMI 1640 medium without glucose

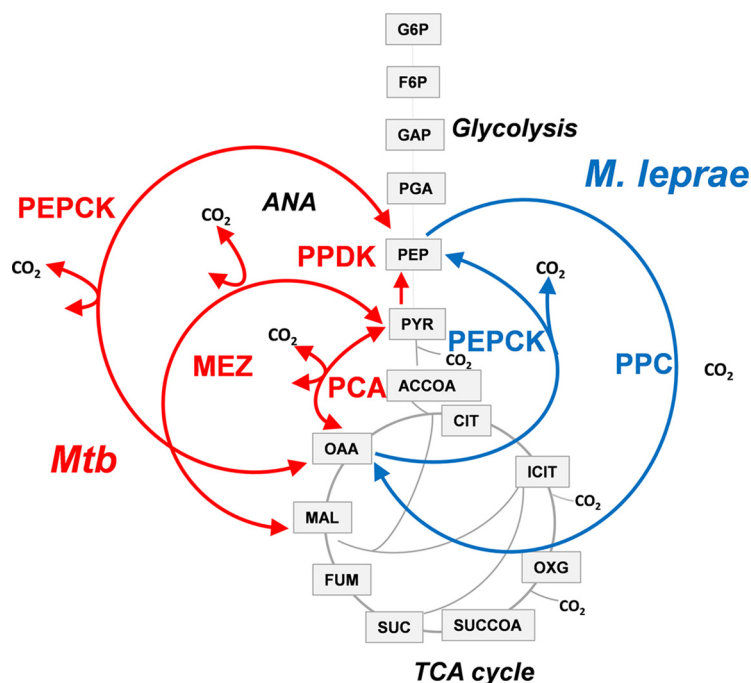


FIG 3 Anaplerotic nodes of *M. leprae* versus *M. tuberculosis* (*Mtb*). Enzymes of the node are PEP carboxylase (PPC), PEP carboxykinase (PEPCK), malic enzyme (MEZ), pyruvate phosphate dikinase (PPDK), and pyruvate carboxylase (PCA). Metabolites of glycolysis, TCA cycle, and ANA (anaplerotic node) are malate (MAL), oxaloacetate (OAA), fumarate (FUM), succinate (SUC), succinyl coenzyme A (SUCCOA), 2-oxoglutarate (OXG), isocitrate (ICIT), citrate (CIT), acetyl coenzyme A (ACCOA), pyruvate (PYR), phosphoglyceric acid (PGA), glyceraldehyde-3-phosphate (GAP), fructose-6-phosphate (F6P), and glucose-6-phosphate (G6P).

supplemented with 100% [U-¹³C₆] labeled glucose (Cambridge Isotopes Laboratories) and 10% fetal bovine serum for 72 h.

(iii) THP-1 cell culture and *M. tuberculosis* infection. The THP-1 human monocytic cell line was obtained from ATCC TIB-202 and was cultured as previously described (8). Briefly, cells were grown in RPMI 1640 medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (Sigma). Macrophages were generated by differentiation of monocytes using 50 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) for 72 h at 37°C, 5% CO₂, and 95% humidity, and were used for infection assays. Bacterial infections were performed as previously described (8). Each flask was seeded with 1 × 10⁶ THP-1 cells, and differentiated cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 0.49 mM Mg²⁺ and 0.68 mM Ca²⁺ (PBS+ [PBS supplemented with CaCl₂ and MgCl₂]). *M. tuberculosis* cultures were grown exponentially in Middlebrook 7H9 liquid medium to an optical density of 1.0 (1 × 10⁸ CFU ml⁻¹) for the infection and then washed in PBS and resuspended in RPMI 1640 medium. A total of 1 ml of bacterial suspension was added to each flask to achieve a MOI of 5 and incubated for 3 to 4 h. After incubation, the macrophages were washed three times with PBS+ (Sigma-Aldrich), and 30 ml of RPMI 1640 medium containing 100% [U-¹³C₆] glucose (Cambridge Isotope Laboratories) was added to each flask and incubated for 48 h at 37°C and 5% CO₂.

(iv) [U-¹³C₆]glucose labeling of bacterial cultures in RPMI 1640 medium. *M. leprae* bacilli (3 × 10⁸) were maintained in RPMI 1640 medium containing 100% [U-¹³C₆]glucose at 33°C for 48 h. *M. tuberculosis* bacilli (1 × 10⁸) were maintained in RPMI 1640 medium containing 100% [U-¹³C₆]glucose at 37°C, 150 rpm for 48 h. After incubation, bacterial cultures were centrifuged at 11,000 × *g* for 10 min, and the amino acid extract was prepared as previously described (8), proceeding as summarized below.

(v) Amino acid extraction. Infected Schwann cells and macrophages were harvested by removing the culture medium, and the adhered cells were washed with 3 ml

of ice-cold PBS and lysed with 0.1% Triton X-100 (8). The cellular and bacterial fractions for both infection models were harvested by differential centrifugation method (8). The bacterial pellet was washed twice with RIPA buffer (radioimmunoprecipitation assay buffer) (Sigma), and both bacterial and soluble amino acids from the cellular compartment were subjected to hydrolysis with 6 N hydrochloric acid (HCl) at 100°C overnight. After acid hydrolysis, samples were dried with nitrogen gas, followed by the addition of 1 ml of distilled water. Then, the samples were transferred to another tube and centrifuged at 11,000 × *g*. After centrifugation, samples were dried using nitrogen gas.

(vi) ¹³C mass isotopomer analysis. Amino acid hydrolysates were dried and derivatized using pyridine and *tert*-butyldimethyl silyl chloride (TBDMSCl) (Sigma) (21). Amino acids were analyzed using a VF-5ms inert 5% phenyl-methyl column (Agilent Technologies) on a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) system. Due to hydrolysis, amino acid pairs aspartate/asparagine and glutamine/glutamate were detected together as a single pool in MS analysis. MS data were extracted using Chemstation GC-MS software (Agilent Technologies) and were baseline corrected using Metalign (22). Mass isotopomer data were corrected for natural isotope effects using MSCorr program (34). Average ¹³C in an amino acid was calculated from the fractional abundance of the ¹³C mass isotopomer in the entire fragment (21). Graphical representation and statistical analysis of the data were performed by using Graph-Pad Prism 8.0.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/mBio.02351-19>.

FIG S1, TIF file, 0.2 MB.

FIG S2, TIF file, 0.2 MB.

FIG S3, TIF file, 0.3 MB.

DATA SET S1, XLSX file, 0.01 MB.

DATA SET S2, XLSX file, 0.01 MB.

DATA SET S3, XLSX file, 0.01 MB.

ACKNOWLEDGMENTS

This research has been supported in part by grants from the RCUK-CONFAP Research Partnership Call (MR/M026434/1), BBSRC grant (BB/L022869/1), Medical Research Council (MR/K01224X/1) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (310155/2017-7 and 313633/2017-7).

We declare that we have no competing interests.

REFERENCES

- World Health Organization. 2015. Global leprosy update, 2015: time for action, accountability and inclusion. *Wkly Epidemiol Rec* 91:405–420.
- Lockwood DN, Suneetha S. 2005. Leprosy: too complex a disease for a simple elimination paradigm. *Bull World Health Organ* 83:230–235.
- Aerts A. 2019. Leprosy: the world's oldest human-rights issue. *Nature* 567:30. <https://doi.org/10.1038/d41586-019-00740-7>.
- Hotez PJ, Bottazzi ME, Franco-Paredes C, Ault SK, Periago MR. 2008. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2:e300. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000300>.
- Malathi M, Thappa DM. 2013. Fixed-duration therapy in leprosy: limitations and opportunities. *Indian J Dermatol* 58:93–100. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.108029>.
- Pattyn SR. 1973. The problem of cultivation of *Mycobacterium leprae*. A review with criteria for evaluating recent experimental work. *Bull World Health Organ* 49:403–410.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honoré N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. 2001. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 409:1007–1011. <https://doi.org/10.1038/35059006>.
- Beste DJ, Nöh K, Niedenföhr S, Mendum TA, Hawkins ND, Ward JL, Beale MH, Wiechert W, McFadden J. 2013. ¹³C-flux spectral analysis of host-pathogen metabolism reveals a mixed diet for intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem Biol* 20:1012–1021. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2013.06.012>.
- Rhee KY, de Carvalho LP, Bryk R, Ehrt S, Marrero J, Park SW, Schnappinger D, Venugopal A, Nathan C. 2011. Central carbon metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*: an unexpected frontier. *Trends Microbiol* 19:307–314. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.03.008>.
- Brzostek A, Pawelczyk J, Rumijowska-Galewicz A, Dziadek B, Dziadek J. 2009. *Mycobacterium tuberculosis* is able to accumulate and utilize cholesterol. *J Bacteriol* 191:6584–6591. <https://doi.org/10.1128/JB.00488-09>.
- Pandey AK, Sassetti CM. 2008. Mycobacterial persistence requires the utilization of host cholesterol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:4376–4380. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711159105>.
- Marques MA, Berrêdo-Pinho M, Rosa TL, Pujari V, Lemes RM, Lery LM,

- Silva CA, Guimarães AC, Atella GC, Wheat WH, Brennan PJ, Crick DC, Belisle JT, Pessolani MC. 2015. The essential role of cholesterol metabolism in the intracellular survival of *Mycobacterium leprae* is not coupled to central carbon metabolism and energy production. *J Bacteriol* 197:3698–3707. <https://doi.org/10.1128/JB.00625-15>.
13. Wheeler PR. 2003. Leprosy – clues about the biochemistry of *Mycobacterium leprae* and its host-dependency from the genome. *World J Microbiol Biotechnol* 19:1–16. <https://doi.org/10.1023/A:1022577505382>.
 14. Jin SH, An SK, Lee SB. 2017. The formation of lipid droplets favors intracellular *Mycobacterium leprae* survival in SW-10, non-myelinating Schwann cells. *PLoS Negl Trop Dis* 11:e0005687. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005687>.
 15. Mattos KA, Lara FA, Oliveira VGC, Rodrigues LS, D'Avila H, Melo RCN, Manso PPA, Sarno EN, Bozza PT, Pessolani MCV. 2011. Modulation of lipid droplets by *Mycobacterium leprae* in Schwann cells: a putative mechanism for host lipid acquisition and bacterial survival in phagosomes. *Cell Microbiol* 13:259–273. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01533.x>.
 16. de Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT. 2012. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107:156–166. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762012000900023>.
 17. Mattos KA, Oliveira VC, Berrêdo-Pinho M, Amaral JJ, Antunes LC, Melo RC, Acosta CC, Moura DF, Olmo R, Han J, Rosa PS, Almeida PE, Finlay BB, Borchers CH, Sarno EN, Bozza PT, Atella GC, Pessolani MC. 2014. *Mycobacterium leprae* intracellular survival relies on cholesterol accumulation in infected macrophages: a potential target for new drugs for leprosy treatment. *Cell Microbiol* 16:797–815. <https://doi.org/10.1111/cmi.12279>.
 18. Franzblau SG. 1988. Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium. *J Clin Microbiol* 26:18–21.
 19. Ishaque M, Sticht-Groh V. 1993. Investigations into the growth of *Mycobacterium leprae* in a medium with palmitic acid under different gaseous environments. *Microbios* 75:171–179.
 20. Medeiros RC, Girardi KD, Cardoso FK, Mietto BS, Pinto TG, Gomez LS, Rodrigues LS, Gandini M, Amaral JJ, Antunes SL, Corte-Real S, Rosa PS, Pessolani MC, Nery JA, Sarno EN, Batista-Silva LR, Sola-Penna M, Oliveira MF, Moraes MO, Lara FA. 2016. Subversion of Schwann cell glucose metabolism by *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem* 291:21375–21387. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725283>.
 21. Masakapalli SK, Kruger NJ, Ratcliffe RG. 2013. The metabolic flux phenotype of heterotrophic *Arabidopsis* cells reveals a complex response to changes in nitrogen supply. *Plant J* 74:569–582. <https://doi.org/10.1111/tpj.12142>.
 22. Lommen A. 2009. MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal Chem* 81:3079–3086. <https://doi.org/10.1021/ac900036d>.
 23. Marques MA, Neves-Ferreira AG, da Silveira EK, Valente RH, Chapeaurouge A, Perales J, da Silva Bernardes R, Dobos KM, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MC. 2008. Deciphering the proteomic profile of *Mycobacterium leprae* cell envelope. *Proteomics* 8:2477–2491. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700971>.
 24. Zimmermann M, Kogadeeva M, Gengenbacher M, McEwen G, Mollenkopf HJ, Zamboni N, Kaufmann SHE, Sauer U. 2017. Integration of metabolomics and transcriptomics reveals a complex diet of *Mycobacterium tuberculosis* during early macrophage infection. *mSystems* 2:e00057-17. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00057-17>.
 25. Serafini A, Tan L, Horswell S, Howell S, Greenwood DJ, Hunt DM, Phan MD, Schembri M, Monteleone M, Montague CR, Britton W, Garza-Garcia A, Snijders AP, VanderVen B, Gutierrez MG, West NP, de Carvalho L. 2019. *Mycobacterium tuberculosis* requires glyoxylate shunt and reverse methylcitrate cycle for lactate and pyruvate metabolism. *Mol Microbiol* 112:1284–1307. <https://doi.org/10.1111/mmi.14362>.
 26. Jha MK, Morrison BM. 2018. Glia-neuron energy metabolism in health and diseases: new insights into the role of nervous system metabolic transporters. *Exp Neurol* 309:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.07.009>.
 27. Brown AM, Evans RD, Black J, Ransom BR. 2012. Schwann cell glycogen selectively supports myelinated axon function. *Ann Neurol* 72:406–418. <https://doi.org/10.1002/ana.23607>.
 28. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, III, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>.
 29. Basu P, Sandhu N, Bhatt A, Singh A, Balhana R, Gobe I, Crowhurst NA, Mendum TA, Gao L, Ward JL, Beale MH, McFadden J, Beste D. 2018. The anaplerotic node is essential for the intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* 293:5695–5704. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.001839>.
 30. Gokarn RR, Eiteman MA, Altman E. 2000. Metabolic analysis of *Escherichia coli* in the presence and absence of the carboxylating enzymes phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate carboxylase. *Appl Environ Microbiol* 66:1844–1850. <https://doi.org/10.1128/aem.66.5.1844-1850.2000>.
 31. Klapa MI, Aon JC, Stephanopoulos G. 2003. Systematic quantification of complex metabolic flux networks using stable isotopes and mass spectrometry. *Eur J Biochem* 270:3525–3542. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03732.x>.
 32. Sauer U, Eikmanns BJ. 2005. The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 29:765–794. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.002>.
 33. Lobato LS, Rosa PS, da Silva Ferreira J, da Silva Neumann A, da Silva MG, do Nascimento DC, Soares CT, Pedrini SCB, Oliveira DS, Monteiro CP, Pereira GMB, Ribeiro-Alves M, Hacker MA, Moraes MO, Pessolani MCV, Duarte RS, Lara FA. 2014. Statins increase rifampin mycobactericidal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5766–5774. <https://doi.org/10.1128/AAC.01826-13>.
 34. Wahl SA, Dauner M, Wiechert W. 2004. New tools for mass isotopomer data evaluation in ^{13}C flux analysis: mass isotope correction, data consistency checking, and precursor relationships. *Biotechnol Bioeng* 85:259–268. <https://doi.org/10.1002/bit.10909>.