UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

NATÁLIA APARECIDA DE PAULA

Pele humana como modelo ex vivo para manutenção do bacilo *Mycobacterium leprae*

Ribeirão Preto

NATÁLIA APARECIDA DE PAULA

Pele humana como modelo ex vivo para manutenção do bacilo Mycobacterium leprae

Versão Original

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular

Orientador: Prof. Dr. Marco Andrey Cipriani Frade

Ribeirão Preto 2019 Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação na publicação Serviço de Biblioteca e Documentação Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FICHA CATALOGRÁFICA

De Paula, Natália Aparecida

Pele humana como modelo ex vivo para manutenção do bacilo *Mycobacterium leprae*, 2019.

147 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Andrey Cipriani Frade, Marco.

1. *Mycobacterium leprae*; 2. Cultura ex vivo; 3. Viabilidade; 4. Morfologia; 5. hOSEC

Nome: DE PAULA, Natália Aparecida

Título: Pele humana como modelo ex vivo para manutenção do bacilo Mycobacterium leprae

	Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor e Ciências.	da em
Aprovado em:		
	Banca Examinadora	
Prof Dr		
<u> </u>		
Instituição:		
Julgamento:		
Profa. Dra.		
Instituição:		
Julgamento:		
Prof.Dr.		
Instituição:		
Julgamento:		

DEDICATÓRIA

Às pessoas acometidas pela Hanseníase.

Agradecimentos

EPÍGRAFE

"Caminhante, não há caminho, o caminho se faz ao caminhar". (Antonio Machado)

> "Nunca despreze o que parece ser desprezível" (Sem autor)

RESUMO

DE PAULA, Natália Aparecida. Pele humana como modelo ex vivo para manutenção do bacilo *Mycobacterium leprae.* 2019. 147f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Mycobacterium leprae (M. leprae), descrito como causador da hanseníase em 1873, ainda hoje não há meios de cultivá-lo artificialmente in vitro, sendo que atualmente a única forma de mantêlo viável e replicando-se é a inoculação in vivo, principalmente em camundongos nude, porém trata-se de um modelo in vivo, trabalhoso e demorado. Esse trabalho propõe padronizar o cultivo do M. leprae, em modelo ex vivo, a partir de explantes de pele humana (hOSEC - human organotypic skin explant culture) tanto para ensaios laboratoriais quanto para auxílio clínico. Para isso, M. leprae, cepa Thai-53, obtido de camundongos nude, foi inoculado em fragmentos de pele humana e mantidos em placas com meio de cultura DMEM, a 5% de CO². A manutenção, crescimento e morfologia dos bacilos nos explantes foram avaliadas após os períodos de cultura (4, 7, 14, 28 e 60 dias) por coloração de Fite-Faraco (FF) e por biologia molecular (RLEP/16s rRNA). Após 28 e 60 dias de cultura, bacilos foram recuperados dos explantes e inoculados na pata de camundongo nude para avaliar manutenção da viabilidade e infectividade. À coloração FF, bacilos foram encontrados em todos os tempos nas formas bacilar íntegra e fragmentada, isolados ou formando alguns aglomerados e raras globias. A viabilidade bacilar foi demonstrada pela positividade da RT-PCR para 16s rRNA em todos os explantes em todo o período de cultura. Dentre os animais inoculados com os bacilos previamente cultivados nos explantes por 28 e 60 dias, após manutenção por 5 meses, 28,4% apresentaram-se positivos para os bacilos, em pelo menos uma das técnicas utilizadas, FF (31,8%), Zihel-Neelsen em suspensão de macerado da pata (77,3%) e RT-PCR (45%). Suspensão de bacilos oriundas de raspados dérmicos e hansenomas de pacientes, foram inoculadas nos explantes e cultivados da mesma maneira já citada, mantendose positivas ao FF e RT-PCR após cultivo médio de 28 dias. Os bacilos de amostras clínicas também foram recuperados dos explantes e inoculados nos camundongos e também apresentaram positividade após cinco meses de manutenção in vivo. Pela primeira vez na literatura, nossos resultados demonstraram com sucesso que é possível manter o *M. leprae* viável no modelo de pele humana *ex vivo* por até 60 dias, tanto a partir de amostras laboratoriais quanto clínicas, importante passo no desenvolvimento de modelos experimentais para estudos da biologia do *M. leprae* e suas interações, além de clínicos, como imunologia e susceptibilidade a drogas.

Palavras-chave: *Mycobacterium leprae;* Cultura ex-vivo; Viabilidade; Morfologia; hOSEC.

ABSTRACT

DE PAULA, Natália Aparecida. Human skin as an ex vivo model for maintenance of the *Mycobacterium leprae* bacillus. 2019. 147f. Thesis (PhD in Cell and Molecular Biology) - Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Mycobacterium leprae (*M. leprae*), described as the cause of leprosy in 1873, there is still no way to grow it artificially in vitro, and currently the only way to keep it viable and replicating is in vivo inoculation, especially in nude mice, but it is an in vivo, laborious and time-consuming model. This work proposes to standardize the cultivation of *M. leprae*, in an ex vivo model, from human organotypic skin explant culture (hOSEC) for both laboratory and clinical assistance. For this, M. *leprae*, Thai-53 strain, obtained from nude mice, was inoculated into fragments of human skin and kept in plates with DMEM culture medium, at 5% CO2. The maintenance, growth and morphology of the bacilli in the explants were evaluated after culture periods (4, 7, 14, 28 and 60 days) by Fite-Faraco staining (FF) and by molecular biology (RLEP / 16S rRNA). After 28 and 60 days of culture, bacilli were recovered from the explants and inoculated into the nude mouse paw to evaluate maintenance of viability and infectivity. At FF staining, bacilli were found at all times in whole and fragmented bacillary forms, isolated or forming some agglomerates and rare globes. Bacillary viability was demonstrated by the positivity of RT-PCR to 16S rRNA in all explants throughout the culture period. Among the animals inoculated with the bacilli previously cultured in the explants for 28 and 60 days, after maintenance for 5 months, 28.4% were positive for the bacilli in at least one of the techniques used, FF (31.8%), Zihel-Neelsen in paw maceration suspension (77.3%) and RT-PCR (45%). Bacilli's suspension of bacilli from skin smear and injury biopsy of patients were inoculated into the explants and cultured in the same manner as mentioned above, and show positivity for FF and RT-PCR after an average culture of 28 days. Clinical sample bacilli were also recovered from the explants and inoculated in the mice and also showed positivity after five months of in vivo maintenance. For the first time in the literature, our results have successfully demonstrated that it is possible to maintain M. leprae viable in the ex vivo human skin model for up to 60 days, both from laboratory and clinical samples, an

important step in the development of experimental models for studies the biology of *M. leprae* and its interactions, as well as clinical, such as immunology and drug susceptibility.

Keywords: Mycobacterium leprae; ex-vivo culture; viability; morphology; hOSEC

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ilustração da organização da pele humana. Epiderme, derme e hipoderme	
e suas estruturas sensoriais	27
Figura 2 - Pele usada para a montagem do hOSEC	36
Figura 3 - Placa de cultura com o hOSEC	37
Figura 4 - Camundongo nude – Extração de bacilos do coxim plantar	38
Figura 5 - Controle microbiológico	40
Figura 6 - Processo de Inoculação dos explantes de pele	41
Figura 7 - Equipamentos utilizados nos testes de dissociação mecânica dos	
explantes de pele	45
Figura 8 - Caixa de camundongos nude dentro de fluxo lâminar onde são	
manipulados assepticamente	54
Figura 9 - Figura demonstrativa do hOSEC	58
Figura 10 - Imagem demonstrativa das seringas usadas para inoculação	59
Figura 11 - Histomorfologia dos explantes ao longo do período de cultura	61
Figura 12 A - Histomorfologia dos explantes de dois indivíduos distintos ao longo do	
período de cultura	62
Figura 12 B - Histomorfologia dos explantes de dois indivíduos distintos ao longo do	
período de cultura	63
Figura 13 A - Histomorfologia dos explantes inoculados com MLV e Salina ao longo	
do período de cultura	64
Figura 13 B - Histomorfologia dos explantes inoculados com MLV e Salina ao longo	
do período de cultura	65
Figura 14 - Fotomicrografia do ensaio de Viabilidade de suspensão bacilar	66
Figura 15 - Bacilos nas diferentes regiões do explante	69
Figura 16 - Diversidade na morfologia dos bacilos identificados nos explantes	71
Figura 17 - Morfologia dos bacilos segundo Adolpho Lutz	72
Figura 18 - Formas bacilares descritas por Paldrock e Souza-Araujo	73

Figura 19 -	Fotodocumentação de gel de agarose para avaliação da integridade do	
	RNA	75
Figura 20 -	Quantificação de RNA total por grupo de tratamento em cada pele	76
Figura 21 -	Curva de amplificação – Amostras quantificadas em NanoDrop [®]	79
Figura 22 -	Curva de amplificação – Amostras quantificadas em Qubit [®]	79
Figura 23 -	Curva de amplificação de gene endógeno com amostras purificação	80
Figura 24 -	Threshold Cycle (C_T) de RT-PCR 18S rRNA grupo Salina por pele	84
Figura 25 -	Threshold Cycle (C_T) de RT-PCR 18S rRNA Grupo MLV por pele	86
Figura 26 -	Threshold Cycle (C_T) da PCR para GAPDH separado por pele	88
Figura 27 -	Viabilidade relativa da pele MLV (cDNA/DNA)	90
Figura 28 -	Threshold Cycle (C_T) de RT-PCR para o alvo 16S rRNA separado por pele.	93
Figura 29 -	Threshold Cycle (C _T) da PCR para o alvo RLEP separado por pele	94
Figura 30 -	Viabilidade relativa do <i>M. leprae</i> (16S rRNA/RLEP)	96
Figura 31 -	Threshold Cycle (C _T) de cada explante para TGF-b (MLV – Salina)	99
Figura 32 -	Expressão relativa de TGF-b em cada Pele e grupo de inoculação	100
Figura 33 -	Seringa e agulha de inoculação da Pele 4	102
Figura 34 -	Bacilos em cortes de Fite-Faraco da Pele 4	103
Figura 35 -	Histopatologia da região do inóculo na pata do camundongo	107
Figura 36 -	Macerado de pata de camundongo nude com inóculo de hOSEC	109
Figura 37 -	Fotomicrografia da pata do camundongo nude com bacilos	112
Figura 38 -	Imagens de aspectos clínicos dos pacientes	114

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Distribuição do número de bacilos por explante durante a cultura	68
Gráfico 2 - RNA total dos grupos MLV e Salina	77
Gráfico 3 - Quantificação de RNA total das 3 peles	78
Gráfico 4 – Quantificação de DNA total das 3 peles	82
Gráfico 5 - <i>Threshold Cycle</i> (C _T) de RT-PCR 18S rRNA de todos explantes	83
Gráfico 6 - <i>Threshold Cycle</i> (C _T) de RT-PCR 18S rRNA - Grupo Salina	84
Gráfico 7 - Threshold Cycle de RT-PCR 18S rRNA – Grupo MLV	85
Gráfico 8 - Threshold Cycle (C _T) de RT-PCR 18S rRNA – Grupo MLV e Salina em cada	
pele	86
Gráfico 9 - <i>Threshold Cycle</i> (C _T) da PCR para GAPDH	87
Gráfico 10 - Threshold Cycle da PCR para o alvo GAPDH, média de cada pele	88
GRáfico 11 - Threshold Cycle de RT-PCR para o alvo 16S rRNA	92
Gráfico 12 - <i>Threshold Cycle</i> (C _T) PCR para RELP	94
Gráfico 13 - Threshold Cycle médio de TGF- eta	98
Gráfico 14 - Expressão gênica relativa de TGF- eta entre explantes com <i>M. leprae</i> e	
salina	101
Gráfico 15 - RNA total Pele Masculina e Pele Feminina	104
Gráfico 16 - RNA total por grupo de tratamento da pele 4	104
Gráfico 17 - C⊤ médio da RT-PCR para 16S rRNA dos explantes Pele 4	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Sequência de <i>primers</i> usados para amplificação de cDNA	48
Tabela 2 - Sequência de <i>primers</i> usados para amplificação de DNA	51
Tabela 3 - Razão entre as absorbâncias 260/280 das amostras de RNA	75
Tabela 4 – Quantificação de DNA e C⊤s com protocolos diferentes	81
Tabela 5 - Threshold Cycle para o alvo 16S rRNA – Viabilidade do bacilo	91
Tabela 6 - Teste de temperatura de annealing para primers FtsZ	97
Tabela 7 - Casuística dos animais inoculados com suspensão do hOSEC	106
Tabela 8 - Resultados da Inoculação da suspensão de hOSEC in vivo	108
Tabela 9 - Casuística dos animais inoculados com suspensão da Pele 4	110
Tabela 10 – Resultado Inoculação da suspensão de hOSEC (Pele 4) in vivo	110
Tabela 11 - Positividade das patas inoculadas com suspensão de hOSEC da Pele 4	111
Tabela 12 - Caracterização demográfica e nosológica dos pacientes	113
Tabela 13 - Dados laboratoriais dos pacientes	115
Tabela 14 - Casuística das amostras dos pacientes para inoculação em hOSEC	116

Introdução	17
Mycobacterium leprae	17
Cepas	19
Hanseníase	19
Aspectos histopatológico	21
Tratamento e Resistência medicamentosa	22
Modelos experimentais	23
Modelo Experimental para Pele	25
Modelos de Cultivo para o <i>M. leprae</i>	28
Modelos Experimentais para hanseníase	31
Objetivo	33
Objetivos específicos:	33
Metodologia	34
2.1 Aspectos Éticos, humano e animal	34
2.2 Cultura Organotípica de Explante de Pele Humana – (hOSEC-Human Organotypic Skin Explant Culture)	34
2.3 Obtenção do <i>Mycobacterium leprae</i>	36
2.4 Coloração de Ziehl-Neelsen	37
2.5 Ensaio de Viabilidade do Mycobacterium leprae purificado em suspensão	38
2.6 Inoculação no modelo hOSEC e cultivo	39
2.7 Estudo Histomorfológico	41
2.7.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)	41
2.7.2 Coloração Fite-Faraco	42
2.8 Estudo Molecular	43
2.8.1 RNA	43
2.8.2 DNA	49
2.8.3 Análise das PCRs – Expressão gênica e Viabilidade	51
2.9 Recuperação de bacilos do hOSEC	52
2. 10 Inoculação <i>in vivo</i>	52
2.11 Ensaio de aplicação de inóculos clínicos no modelo hOSEC	54
2.11.1 Indivíduos	54
2.11.2 Coleta de material	54

Sumário

2.11.3 Processamento das amostras clínicas e inoculação	55
2.11 Análise estatística	55
2.12 Descarte de Resíduos Biológicos	56
Resultados	57
3.1 Modelo hOSEC: padronização e ajustes	57
3.2 Caracterização da pele dos doadores	58
3.3 Análise dos explantes em cultura	59
3.4 Análise da suspensão bacilar para inoculação	65
3.4 Análise dos explantes inoculados	66
3.4.3. Pele Feminina	66
A) RNA	73
B) DNA	77
A) Pele	81
B) Bacilos	90
	93
C) Modulação da resposta imune	96
3.4.4 Pele Masculina: observações	
3.5 Viabilidade e Infectividade dos bacilos após cultura no hOSEC	
Pele Feminina (Pele1, Pele2, Pele3):	
Pele Masculina (Pele 4):	
3.6 hOSEC e inóculos clínicos	111
3.6.1 - Caracterização clínica dos pacientes (Ambulatório da Dermatologia de Hanse HCFMRPUSP)	eníase (ADMH) – 112
Discussão	117
Conclusão	
Referências	132
ANEXO 1 - Certificado de aprovação do comitê de ética em Pesquisa em seres humanos	do HCRP e
FMRP-USP	145
ANEXO 2 – Certificado de aprovação do comitê de ética no uso de animais	

Mycobacterium leprae

O *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), ou bacilo de Hansen, foi o primeiro patógeno bacteriano a ser identificado e associado como causa de uma doença infecciosa no homem, descrito por Gerhard Henrik Armauer Hansen em Bergen na Noruega no ano de 1873, em uma época em que as doenças eram associadas a hereditariedade e ainda, muitas vezes como punição divina (HANSEN; LOOFT, 1895).

Hansen, que era um jovem médico, passou longo período visitando e estudando doentes por toda a Noruega e países vizinhos que vinham nos últimos anos registrando um aumento no número de casos de lepra. Inquieto com a ideia da hereditariedade da lepra, frente a suas observações epidemiológicas realizadas nos lugares que visitou, analisou incansavelmente material oriundo de lesões comuns nos leprosos, e identificando formas microscópicas associando-as à lepra. A partir de 1873, Hansen começou a defender e publicar sobre seus achados nas amostras dos leprosos, e a defender a ideia de que a lepra não era uma doença hereditária, e sim infecto-contagiosa, causada por um microrganismo (BECHLER, 2012).

Hoje sabemos que o microrganismo identificado por Hansen é um patógeno intracelular obrigatório causador da lepra, doença atualmente conhecida no Brasil por hanseníase, uma doença crônica historicamente relatada desde 1500 a.c. (LEVÍTICO, BÍBLIA).

Taxonomicamente, o *M. leprae* pertence à ordem *Actinomycelalis* e família *Mycobaderiaceae*, o gênero *Mycobacterium* também inclui o complexo *Mycobacterium tuberculosis (M.tuberculosis)*, o complexo *Mycobacterium avium*, e outras micobactérias e numerosas espécies saprófitas presentes no solo e na água. O *M. leprae* apresenta-se sob a forma de bacilo reto ou levemente encurvado, com extremidades arredondadas, medindo aproximadamente de 1 a 8 μm de comprimento e 0,3 μm de diâmetro (MACIEIRA, 2000; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). No homem, esse bacilo é um parasito encontrado infectando predominantemente macrófagos, onde pode ser observado formando aglomerados ou globias.

Além dos macrófagos, o *M. leprae* invade células do sistema nervoso periférico, célula de Schwann, que tem grande importância na patogênese da hanseníase. A replicação do bacilo é muito lenta e ocorre por processo de divisão binária, que pode levar até 20 dias para se completar (COWDRI, 1940; MACIEIRA, 2000; PINHEIRO et al., 2011).

É uma micobactéria que pode ser categorizada como gram-positiva, porém a característica que a identifica é ser álcool-ácido resistente, com uma parede celular constituída de peptideoglicanos entrelaçados e ligados a cadeias polissacarídeas, que servem de suporte para os ácidos micólicos, que contribui para sua característica de ser fortemente álcool-ácido resistente quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen (MACIEIRA, 2000; PINHEIRO et al., 2011).

As micobactérias, como o *M. leprae*, bacilos Álcool-Ácido Resistentes (BAAR), possuem na sua parede celular uma grande concentração de lipídeos, devido à presença de ceras e ácidos graxos (ácidos micólicos), o que dificulta a sua identificação por meio das colorações tradicionais. No método de Ziehl-Neelsen (também chamada de Fite-Faraco quando adaptada para material parafinado) os BAAR são corados pela fucsina fenicada (vermelho) e por sua parede ser resistente ao álcool, elas não perdem a coloração avermelhada após o banho em solução álcool-ácida, outras bactérias quando lavadas com o álcool perdem a coloração vermelha e se coram com o segundo corante da reação, azul-de-metileno (azul) (FITE; CAMBRE; TURNER, 1947).

A sequência completa do genoma de *M. leprae* foi revelada no início dos anos 2000 (COLE et al., 2001), contendo 3.268.203 pares de bases (pb), e com um teor médio de G + C de 57,8%, e 1600 genes. Estes valores são muito mais baixos do que os relatados para o genoma de *M. tuberculosis*, que possui 4.000 genes, 4.411.532 bp e 65,6% G + C (COLE, et al., 1998). Apenas 49,5% do genoma do *M. leprae* contém genes codificadores de proteínas, comparados com 90,8% do *M. tuberculosis*, que divide um ancestral comum com o *M. leprae* (COLE et al., 2001; SINGH; COLE, 2011).

Cepas

O genoma do *M. leprae* é excepcionalmente conservado, sendo um bacilo altamente clonal. Análises comparativas com o genoma do *M. tuberculosis* indicam que o *M. leprae* sofreu uma evolução redutiva, e acumulou mais de 1130 pseudogenes que ocupam a metade de seu genoma (COLE et al., 2001; SINGH; COLE, 2011).

Os estudos que tentam determinar cepas diferentes, buscam encontrar variações genômicas entre isolados de *M. leprae* de fontes distintas, e a maioria, toma como base o isolado, ou cepa, 'TN', originalmente isolada de um paciente em Tamil Nabu, Índia (EIGLMEIER et al., 1993).

Singh e Cole (2011) compararam a cepa TN com outros três isolados, de diferentes locais do mundo: Brasil (Br4923), Tailândia (Thai53) e Estados Unidos (NHDP63). A comparação revelou 215 sítios polimórficos, uma conservação notável do genoma, 99,995% de identidade entre isolados de locais geograficamente distantes.

Monot et al. (2015) fizeram comparação das regiões repetitivas de 5 isolados diferentes, TN, Br4923, Thai53, NHDP98 (México) e um isolado da Ethiopia-África e não encontraram nenhuma diferença significativa. Avaliando os SNPs em 400 amostras de 28 países diferentes, observaram que a frequência de SNP no *M. leprae* (1 em 28400 pb) é muito menor comparada a outros microorganismos como o *M. tuberculosis* (1 em 3000 pb) (FLEISCHMANN et al., 2002). Eles encontraram 4 combinações de SNPs, distinguindo 16 subtipos do *M. leprae*.

Hanseníase

O *M. leprae,* é o agente etiológico da Hanseníase, sinonímia de lepra ou doença de Hansen, uma doença infecciosa crônica, com manifestações dermatológicas e neurológicas, curável quando diagnosticada e tratada precocemente, porém pode causar danos progressivos e permanentes à pele, nervos, membros e olhos, tornando-se incapacitante (TALHARI et al., 2015).

A hanseníase é de ocorrência mundial e o Brasil é um dos países com maior ocorrência da doença. De acordo com os últimos relatórios oficiais de 143 países, 214.783 indivíduos foram diagnosticados e notificados em 2016. Dados epidemiológicos mostram que, apesar da efetividade do tratamento, ainda há alta ocorrência de novos casos no Brasil, sugerindo que a taxa de transmissão é contínua (WHO, 2017).

O homem é o principal reservatório de *M. leprae*, dessa forma a transmissão só ocorre de homem para homem, o principal modo de transmissão do bacilo sugerido seria por absorção via respiratória de gotículas de secreção nasal ou oral (NOORDEEN, 1994). O bacilo provoca uma inflamação granulomatosa, e afeta principalmente regiões menos quentes do corpo humano, como a pele, mucosa nasal e nervos periféricos.

A micobactéria tem crescimento lento, e o período de incubação da doença é longo, podendo ser de 2-12 anos. A maioria das pessoas que entra em contato com *M. leprae* não desenvolve a doença, e muitas pessoas infectadas não apresentam sinais clínicos; a caracterização clínica da hanseníase é determinada pela resposta imune do hospedeiro à infecção, e apresenta um espectro de formas clínicas, que pode ser categorizada de acordo com a classificação de Ridley-Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966; HASTINGS et al., 1988; RODRIGUES; LOCKWOOD, 2011; WOROBEC, 2012).

A classificação de Ridley-Jopling (RIDLEY; JOPLING, 1966) é baseada no tipo de lesão na pele e carga bacilar, que subdivide a doença em: forma tubérculoide (TT), na qual o paciente apresenta vigorosa resposta imunecelular (resposta Th1), apresentando poucas lesões e micobactéria não detectável; forma lepromatosa (LL) ou Virchowiana, cujo polo anérgico (resposta Th2) da doença acarreta múltiplas lesões na pele e micobactéria detectável em grande quantidade. E entre esses dois polos há formas definidas como bordeline ou dimorfa, na qual o paciente apresenta alguma resposta imune-celular, múltiplas lesões e resposta imune instável (Rodrigues; Lockwood, 2011). Outra classificação simplificada proposta pela OMS, de caráter apenas operacional, e que é amplamente utilizada na decisão da conduta terapêutica, utiliza o

número de lesões na pele para caracterizar a doença em duas formas: paucibacilar, até cinco lesões; ou multibacilar, presença de mais de cinco lesões.

O fato do *M. leprae* não ser cultivável in vitro, dificulta sua detecção, diagnóstico da doença e avaliação de resistência medicamentosa. Atualmente, devido à ausência de um teste padrão ouro, vários critérios clínicos e laboratoriais são usados para o diagnóstico da hanseníase (BATHIA et al., 1993; WOROBEC, 2012). A avaliação das lesões e nervos pelo clínico treinado é a avaliação mais importante, e as técnicas laboratoriais rotineiras realizadas para ajudar no diagnóstico e classificação da forma clínica incluem: a avaliação microscópica do raspado de incisão dérmica ou esfregaço de tecido na busca de bacilos e a análise histopatológica, porém essas técnicas apresentam limitações, pela dificuldade de encontrar o bacilo nas amostras biológicas, principalmente, na forma paucibacilar da doença ou da infecção recente por *M. leprae*, pois nesses casos os bacilos são raros ou ausentes (SHEPARD; MCRAE, 1968).

Aspectos histopatológico

A ausência de um modelo experimental de infecção para o *M. leprae*, impede que saibamos a exata sequência de eventos que ocorrem na hanseníase, mas após a entrada do bacilo no organismo via mucosa respiratória pode ocorrer a propagação do bacilo para nervos periféricos e pele, onde ele é fagocitado pelas células de Schwann e macrófagos (NG et al., 2000, MASAKI et al., 2013; TRUMAN et al., 2014). Devido sua replicação, que acontece em média a cada 12 dias (LEVY; JI, 2006), o período de incubação em que a doença pode ficar silenciosa sem apresentar nenhum sinal/sintoma é de cinco anos em média (HASTINGS et al., 1988).

De acordo com os dois pólos da doença, tuberculóide (TT) e lepromatoso (LL), histologicamente a interação do bacilo com a pele do hospedeiro pode ser resumida da seguinte forma: <u>Forma clínica TT</u>: formação de granuloma tuberculoide, constituído por agregado de células fagocitárias mononucleares com diferenciação epitelioide bem evidente e participação de células gigantes multinucleadas tipo Langhans no centro da lesão e com a presença de linfócitos que confere um halo denso contornando este granuloma (FLEURY, 1989). Os granulomas do tipo TT estendem-se desde a derme profunda até a papilar, inclusive atingindo a camada basal da epiderme (HASTINGS et al., 1988; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002). Forma clínica LL: a lesão histopatológica mostra um extenso infiltrado celular composto de histiócitos-macrófagos com citoplasma carregado de bacilos, e as chamadas células espumosas, descritas por Virchow em 1863 (VIRCHOW, 1863), que são macrófagos e células de Schwann infectadas pelo *M. leprae* que acumulam grande quantidade de lipídeos, às vezes multivacuoladas, e que parece estar relacionado com a modulação da resposta imune na doença (MATTOS et al., 2010). A epiderme está atrófica/despapilada e a zona sub-epidérmica não está envolvida. O infiltrado virchowiano mesmo quando exuberante não atinge a camada basal da epiderme, ficando separado por uma faixa de fibras colágenas correspondente à derme papilar retificada, conhecida como faixa de Unna (RIDLEY, 1990; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

O *M. leprae* tem tropismo pelos nervos periféricos, onde infecta as células de Schwann. Essa célula é uma célula importante que envolve o axônio constituindo a bainha de mielina, que promove o isolamento neural e está envolvida na velocidade da condução do impulso nervoso. A infecção da célula de Schwann pelo *M. leprae* está relacionada com a ligação de uma glicoproteína da parede do bacilo, phenolic glycolipid I (PGL-1), à molécula distroglicana-α (α-DG) da laminina-2 da célula de Schwann (CAMBIER et al., 2017; MADIGAN et al., 2017; SHIMOJI et al., 1999). A invasão da célula pelo *M. leprae* leva a degeneração celular e perda da bainha de mielina, o que desequilibra o microambiente adequado do neurônio, levando a uma retração axonal, fibrose periaxonal e a resposta inflamatória (MADIGAN et al., 2017; SPIERINGS et al., 2000; MICHELLIN et al., 2012). O dano neural é uma das consequências mais importantes na hanseníase, pois são de difícil regeneração e levam a perdas sensitivas e motoras importantes.

Tratamento e Resistência medicamentosa

O tratamento da hanseníase, em 1940, teve início com a monoterapia usando a dapsona, uma sulfona sintética que tem como alvo desestabilizar a biossíntese de folato na micobactéria, porém na década seguinte, foram relatados os primeiros casos de resistência ao tratamento com a dapsona (WOLCOTT, 1953). Outras drogas, como rifampicina (grupo das ansamicinas), ainda no esquema de monoterapia, começaram a ser empregadas no tratamento, e novas resistências foram relatadas (JACOBSON; HASTINGS, 1976). A partir de 1981, a OMS recomendou que todos os pacientes com hanseníase recebessem a poliquimioterapia (PQT). Atualmente, a OMS recomenda a poliquimioterapia com 3 medicamentos rifampicina, dapsona e clofazimina, em doses diárias e uma dose de reforço mensal, para todos os pacientes com hanseníase, com duração de tratamento de 6 meses para hanseníase PB e 12 meses para hanseníase MB (WHO, 2017).

No final dos anos 1990, foi possível identificar alterações na sequência de DNA da micobactéria que gera resistência aos antibióticos. Resistência à dapsona está relacionada a mutações no gene folP1 que codifica a diidropteroato sintetase, envolvida na biossíntese de folato na micobactéria (KAI et al., 1999); a resistência à rifampicina está associada a mutações no gene rpoB, que codifica a subunidade β da RNA polimerase (HONORE; COLE 1993); e a resistência à fluoroquinolona está associada à mutação no gene gyrA que codifica a subunidade A da DNA-girase (CAMBAU et al., 1997; WILLIAMS; GILLIS, 2004).

Apesar da alta efetividade do regime PQT implantado pela OMS, ainda há países com alta endemia da hanseníase no mundo, como Índia e Brasil, e relatos de pacientes que apresentam resistência e/ou recidivas após o tratamento tem aumentado, sendo que no Brasil, em 2016, foram notificados 1431 casos de recidivas, cerca de 6% entre os casos novos detectados no mesmo ano (WHO, 2017).

Modelos experimentais

Modelos experimentais em pesquisa podem ser definidos como a materialização de uma parte da realidade. Uma das descrições que os dicionários de língua inglesa trazem para a palavra *model* (modelo) é uma "representação tridimensional em escala reduzida; uma descrição simplificada de um sistema" (Oxford dictionaries).

A importância em ter um modelo de geração de conhecimento deriva da necessidade de entender exatamente os mecanismos que geram os dados, fatos e fenótipos, e auxiliar na compreensão dos fenômenos naturais, patogênese das doenças em nível celular e molecular, e fornecer sistemas para desenvolver e testar novas terapias, além de manter os princípios de bioética em relação a intervenções em *anima nobili* (experiências com seres humanos). Nesse sentido, o modelo experimental deve ser, funcionalmente, o mais semelhante possível ao que se objetiva estudar, e deve apresentar demonstração das limitações em relação à realidade que irá representar (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005).

Existem diversos modelos experimentais descritos, e aplicados em diferentes escalas de conhecimento e de fenômeno que se quer estudar, divididos em modelos in vitro, as culturas de células; modelos *ex vivo*, cultura de tecidos e órgãos; modelos *in vivo*, usando os animais de laboratório; e os estudos anatômicos, geralmente em cadáveres (FERREIRA; HOCHMAN; BARBOSA, 2005; RANGANATHA; KUPPAST, 2012; LEBONVALLET et al, 2010).

A cultura de célula, modelo in vitro, é caracterizada por permitir a manutenção de células vivas em laboratório independente do organismo que a originou. Tanto as células eucarióticas como de bactérias e leveduras são modelos experimentais utilizados nos casos em que se deseja avaliar o comportamento molecular, bioquímico, celular e histoquímico de tecidos normais ou patológicos, produzindo entendimento de diversos eventos celulares (por exemplo pinocitose e fusão celular, ou hibridização celular) (FELL, 1972), que geram muitos benefícios científicos e tecnológicos (por exemplo produção de insulina recombinante) (CHEN et al, 1995).

Os modelos *in vivo*, fazem uso de uma infinidade de espécies animais, que podem ser utilizados em todos os campos da pesquisa biológica, desde a investigação dos processos da fisiologia normal, eventos patológicos de doenças (JÖRGENS, 2006), fenômenos biológicos e comportamentais (FAGUNDES; TAHA, 2004), além de serem modelos para testes de terapias e vacinas (MCSHANE et al, 2001).

Em comparação com os modelos in vitro, os animais possibilitam a observação dos eventos no contexto complexo de um organismo composto por vários sistemas que estão interligados e sobre influencia um do outro. E na interface entre os modelos in vitro e *in vivo*, estão os modelos *ex vivo*, que se referem a experimentação de um órgão ou tecido fora do

organismo do qual pertence, com alterações mínimas de condições naturais, permitindo o controle das condições avaliadas, porém mantendo em parte a complexidade do sistema de origem (CASTRO; GILLESPIE; BERNSTEIN, 2019; NUGRAHA et al, 2019; LEBONVALLET et al, 2010).

Modelo Experimental para Pele

Estrutura da Pele Humana

A pele é constituída por uma porção epitelial de origem ectodérmica, a epiderme, e uma porção conjuntiva de origem mesodérmica, a derme. Abaixo e em continuidade com a derme encontra-se a hipoderme, que serve de união entre a pele e os órgãos subjacentes (Junqueira; Carneiro, 2004).

A epiderme humana possui espessura de 0,07 a 0,12 mm e contribui pouco com as propriedades mecânicas da pele (SILVER; FREEWAN; DEVORE, 2001). Ela é constituída por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado. Neste tecido são encontrados quatro tipos celulares: queratinócitos, melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel, com funções de barreira mecânica, produção de citocinas e sinalização celular; síntese de pigmentos; apresentação de antígenos (AG); síntese de catecolaminas e sensibilidade tátil, respectivamente (RABE et al., 2006). Os queratinócitos estão distribuídos de 4 a 5 camadas; os demais tipos celulares estão distribuídos por entre os queratinócitos em locais específicos (GARTNER; HIATT, 2007). Figura 1 - Ilustração da organização da pele humana. Epiderme, derme e hipoderme e suas estruturas sensoriais



Fonte: (<u>https://www.exploringnature.org/db/view/Integumentary-System-Skin;</u> http://www.sld.cu/sitios/medregenerativa/temas.php?idv=27536).

A porção epitelial não contém vasos sanguíneos e recebe nutrientes por difusão a partir dos vasos sanguíneos presentes na derme. No limite inferior da epiderme localiza-se uma camada de células germinativas que se diferenciarão em novas células da epiderme, essa camada é chamada de camada basal (ABRAHAMS; CRAVEN; LUMLEY, 2005; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

A derme é uma camada de tecido conjuntivo de origem mesenquimal, vascularizada, firmemente ligada à epiderme em sua porção superior e ao tecido subcutâneo em sua porção mais profunda. Sua espessura varia de 1 a 4 mm (SILVER; FREEWAN; DEVORE, 2001). Na derme estão os vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, ductos sudoríparos, glândulas sebáceas alveolares e músculos eretores do pelo, ligados aos folículos pilosos (ABRAHAMS; CRAVEN; LUMLEY, 2005; HABIF, 1996). Ela é formada por uma matriz (ácido hialurônico, mucopolissacarídeos e condroitina-sulfato), fibras (colágenas, reticulares e elásticas), células (fibroblastos, macrófagos, mastócitos), e os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, linfócitos e basófilos) que chegam pela corrente sanguínea ao tecido por diapedese (HABIF, 1996; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A derme é constituída por duas camadas distintas, a camada papilar (superior) que se localiza próxima a epiderme, composta por fibras de colágeno disposta aleatoriamente (HABIF, 1996), e a camada reticular (inferior), mais espessa que a papilar, que se

estende da base da camada papilar ao tecido subcutâneo e é composta por fibras espessas de colágeno, que são organizadas paralelamente à superfície da pele.

Cultura ex vivo de Pele

Para os estudos dermatológicos todos os tipos de modelos experimentais são aplicados, com objetivo de se estudar fisiopatologia de doenças, mecanismos de envelhecimento, cicatrização de feridas, testes de fármacos e outros produtos de atividade cutânea.

Há uma tendência mundial de conscientização em minimizar o uso de animais, uma discussão iniciada na década de 50, por Charles Hume, fundador da Federação Universitária de Bem-Estar Animal (UFAW), em 1954, que fez a proposta original para a UFAW levar em consideração alternativas para testes em animais e mudar o estudo científico em experimentos com animais de laboratório, e se concretizou a partir do programa denominado de 3Rs (do inglês: *Reduction, Refinement, Replacement* - Redução, Refinamento, Substituição), que objetiva além de diminuir o número de animais, minimizar a dor e o desconforto e buscar alternativas para a substituição dos testes in vivo (RANGANATHA; KUPPAST, 2012).

Desde 2009, na União Europa, testes de produtos cosméticos em animais são proibidos, e no Brasil embora ainda não exista uma legislação federal, vários estados já sancionaram lei proibindo o uso de animais em testes de cosméticos e itens de higiene pessoal (Lei 777/2013 SP).

Nessa corrente para os estudos dermatológicos há necessidade de desenvolvimento de novas alternativas ao uso de animais, principalmente, para fins de teste de cosméticos e produtos de higiene pessoal. Como modelo *ex vivo*, são empregados os modelos organotípicos de pele, que englobam as peles reconstituídas, formadas por camadas de células, queratinócitos e fibroblastos, que se tornaram mais evidentes nos últimos anos pela utilização e aprimoramento pelas empresas de cosmiatria (REVISTA FAPESP, 2016; CATARINO et al, 2018, PENNACCHI et al, 2015); e os explantes de pele (JACOBS; LEHÉ; HASEGAWA, 2006; ANDRADE et al, 2015; XU et al, 2012, DANSO et al, 2014), que representam melhor o sistema orgânico da pele, mantendo além das camadas de células epidérmicas, a complexidade da camada dérmica com suas estruturas (LEBONVALLET et al, 2010).

Os modelos que usam explante de pele humana consistem em manter pequeno fragmento de pele humana saudável, obtida de cirurgias, em meio artificial composto por meio de cultura com nutrientes, temperatura e oxigenação ótimas e semelhantes ao microambiente de origem. Estudos experimentais em dermatite de contato alérgica, cicatrização de úlceras, têm mostrado que tanto a estrutura dermo-epidérmica e epiderme proliferativa, como a fisiologia do tecido são mantidas por algumas semanas no meio artificial, podendo-se observar a viabilidade/vitalidade celular do modelo utilizando marcação específica para proliferação celular e migração de células de Langerhans (COMPANJEN et al., 2001; JACOB; LEHÉ; HASEGAWA, 2006; LEBONVALLET et al., 2010), expressão de Ki-67 e keratin 6, indicadores de atividade de queratinócitos na epiderme, e síntese de fibras colágenas na derme, para as propriedades histológicas e bioquímicas (XU et al., 2012).

Modelos de Cultivo para o M. leprae

Diferentemente do *M. leprae*, o *M. tuberculosis*, pertencente ao mesmo gênero e descrito uma década mais tarde por Robert Koch, apesar de seu crescimento lento comparado com outros microrganismos (em torno de 24 horas) (Straus, 1980), ainda supera em muito a velocidade de replicação do *M. leprae*, que é em torno de 12 dias, e é facilmente crescido em laboratório em meio axênico Lowenstein-Jensen, além de se ter modelos animais que adquirem a infecção e podem ser estudados para o conhecimento de vários aspectos da micobacteria e da doença, incluindo um leque de possibilidades para teste de drogas e vacinas. Embora sejam micobacterias próximas, desde a descoberta do *M. leprae* inúmeras tentativas de cultiva-lo foram realizadas em diversos meios de cultura e em várias espécies de animais, porém sem muito sucesso.

Vaudremer em 1935 publicou seus experimentos mostrando resultados de suas tentativas com meios de cultivo de diferentes composições, enriquecido com caldo de batata, embora ele tenha citado que em seu trabalho a micobactéria foi isolada e cultivada, estes experimentos foram questionados e considerados equivocados, pois não foi possível reproduzir a metodologia usada por Vaudremer, de forma que os bacilos perdiam suas características patogênicas e tornavam-se inviáveis (LIMA, 1937).

Outras tentativas de cultivo consideraram a importância do baixo teor de oxigênio na cultura. Ishaque M. (1990, 1993) tentou cultivar os bacilos em meio com baixa concentração de oxigênio, ao longo das semanas os bacilos gradualmente perderam o poder de adaptação a crescer no meio artificial e não sobreviveram mais do que 36 semanas de incubação.

Em um recente trabalho (AMAKO, et al., 2016) os autores fizeram tentativas de cultivar os bacilos em meio Kirchner modificado, com o acréscimo de alguns nutrientes (extrato de gema de ovos, piruvato e transferina) e com suplemento de plasma humano, porém, os bacilos mantidos ao longo de 120 dias não apresentaram crescimento exponencial.

O genoma do *M. leprae* comparando-o com o do *M. tuberculosis*, mostrou ter sofrido uma evolução redutiva, no qual o genoma sofreu uma redução de tamanho e acumulou muitos pseudogenes. Essa redução intensa com a perda concomitante de funções catabólicas e respiratórias, parece ter resultado em severas restrições metabólicas (EIGLMEIER et al, 2001; COLE et al, 2001). Assim como o *M. tuberculosis*, o *M. leprae* se apropria do metabolismo de macrófagos a seu favor, subvertendo a função microbicida, sobrevivendo e se multiplicando no interior destas células. Uma vez sobrevivendo à primeira linha de defesa do organismo o bacilo então de forma especial também infecta as células de Schwann (célula glial que envolve os axônios dos neurônios periféricos) uma vez infectadas estas células passam a servir ao bacilo, que induz alterações na programação genética que desdiferencia essa célula (MASAKI, 2013), que perde sua função e passa a abrigar o bacilo que desvia o metabolismo de lipídeo e glicose a seu favor (MATTOS, 2011, MEDEIRO, et al 2016). Isto sugere que o cultivo desta micobactéria em meio isento de células pode não ser possível (LEVY; JI 2006).

Lima e Arantes, em 1939, relataram evidências de que amostras de bacilos obtidas de 3 pacientes (dentre 36) permaneceram viáveis por 5 meses, quando semeados em meio Sauton (meio utilizado na época para crescimento de *M. tuberculosis*), com algumas modificações, entre elas a adição de extrato de glândulas (hipófise, tireoide). Esse aparente excito poderia ser devido a presença de células eucarióticas adicionadas junto com o macerado, porém não podemos

afirmar, o trabalho de Carvalho Lima não apresentou maiores investigações sobre isso e não há na literatura outros relatos sobre novas tentativas para a confirmação deste protocolo.

Esforços em cultivar o *M. leprae in vivo*, tanto para se ter um meio de cultivar e multiplicalo, como para se ter um modelo animal que expresse a patogênese da doença causada pela micobacteria, também foram realizados em vários animais, cerca de 30 espécies de animais já foram inoculadas com o *M. leprae* utilizando-se as mais diversas vias de inoculação, porém, os resultados foram limitados ou de curta duração (MADEIRA; ROSA, 2008; COURET, 1910). Entre eles, o tatu nove-bandas, *Dasypus novemcinctus*, conhecido como hospedeiro natural, na década de 70 foi descoberto como um hospedeiro adequado para a propagação do *M. leprae*, principalmente devido sua menor temperatura corpórea (30-35°C) (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971; BALAMAYOORAN et al 2015).

O cultivo *in vivo* com inoculação do bacilo em coxim plantar de camundongo, descrito na década de 60 por Shepard (SHEPARD, 1960), teve como base a hipótese de que o crescimento do *M. leprae* deveria ocorrer, seletivamente, em locais do corpo de temperatura mais baixa. E a inoculação na pata de camundongos imunocomprometidos mostrou os melhores resultados em relação a manutenção e multiplicação bacilar, provavelmente devido à imunodeficiência celular e à baixa temperatura na pata do camundongo (SHERPARD, 1960; KIRCHHEIMER; STORRS, 1971). Essa é a metodologia que proporcionou avanços nas pesquisas, tanto no estudo do bacilo propriamente dito, quanto nos estudos de resistência às drogas utilizadas na terapia da doença, Essa é a técnica atualmente utilizada para manter o bacilo viável e se multiplicando em laboratório, porém é uma técnica bastante trabalhosa e que requer período longo (maior que 6 meses) de manutenção dos animais para que a replicação satisfatória dos bacilos aconteça.

O cultivo do *M. leprae* in vitro, poderia proporcionar manipulação mais fácil, prática e rápida, porém sua ineficiência ainda impossibilita o avanço no esclarecimento de aspectos básicos envolvidos na transmissão, resistência/suscetibilidade e estudo de novas terapêuticas.

Modelos Experimentais para hanseníase

Embora os modelos experimentais *in vivo* tenham agregado importante avanço nos estudos do *M. leprae* eles são limitantes e não há um animal que apresente o pleomorfismo de manifestações clínicas da hanseníase humana. A hanseníase é uma doença desafiadora, pois possui um espectro clínico/imunológico muito amplo. O modelo experimental ideal para seu estudo seria um animal imunologicamente competente que apresentasse o espectro clínico da doença e episódios reacionais, além de desenvolver neurite em nervos periféricos, e ainda deveria ser um animal com um tempo de sobrevida suficiente para acompanhar o desenvolvimento da doença (MADEIRA; ROSA, 2008).

Armauer Hansen em 1873, após identificar as formas bacilares intracelulares em amostras de pacientes com hanseníase e declarar essa a causa da doença, tentou cultivar os bacilos in vitro e transferi-los para modelo animal, mas sem sucesso (BECHLER, 2012).

As primeiras inoculações *in vivo* que apresentaram algum sucesso foram após a observação do Dr. Chapman Binford, em 1956, de que os bacilos, no homem tem uma preferência natural por regiões de temperatura mais baixas. A partir desta observação Binford conseguiu produzir lesão em orelhas de Hamsters (BINFORD, 1959), Shepard (1960) padronizou a inoculação em patas de camundongos, e Kirchheimer e Storrs (1971) transferiram bacilos para tatu nove-bandas, *Dasypus novemcinctus*, que é o único animal que desenvolve alguns aspectos clínicos semelhante ao da doença humana.

Os tatus, após aproximadamente 9-18 meses desenvolvem nódulos que são típicos de hanseníase lepromatosa, com bacilos em estruturas espumosas de fagolisossomos, depois a doença se dissemina para vários órgãos e afetam nervos periféricos (KIRCHHEIMER; STORRS, 1971).

Camundongos de várias linhagens já foram testados e não apresentaram disseminação sistêmica, os bacilos ficam retidos no granuloma formado na pata inoculada. Os camundongos são mais facilmente mantidos em condições de laboratório e são usados como modelo para teste de eficácia de drogas e resistência. Um modelo que apresentou sucesso na forma disseminada da doença foi um chimpanzé, o qual foi identificado com forma clínica dimorfa ou borderline (BB-BL) após inoculação dos bacilos (MADEIRA; ROSA, 2008).

Colston e Koasaka testaram inoculação em camundongo Nude (animais congenitamente atímicos) que possuem reposta imune limitada, e observaram que após 8 meses, houve disseminação para outras regiões e órgãos (COLSTON; HILSON, 1976; KOASAKA et al., 1976). KARANTH et al., (1990) observaram alterações na quantidade de neuropeptídios de pele e coluna vertebral dos camundongos nudes inoculados com o *M. leprae*, o que poderia indicar um possível modelo para estudo de neuropatias da hanseníase.

Ainda, a hanseníase é uma infecção crônica que, assim como outras infecções por micobactérias, apresenta um recrutamento para o sítio de infecção de células como macrófago, formando um granuloma, que difere dentre as formas da doença quanto a constituição e eficiência em conter o bacilo (PANDYA; TAILOR, 2008; TALHARI et al. 2006; OBADIA; VERARDINO; ALVES, 2011). Modelo murino imunocompetentes são utilizados para estudar a formação de granulomas, uma alternativa para estudo do granuloma humano, seria utilizar linhagens de células humanas. WANG et al., 2013 conseguiram fazer observações relevantes em relação a interação do bacilo com formação do granuloma, utilizando um modelo in vitro de co-cultura de macrófagos infectados com células mononucleares de sangue periférico, porém, este é um modelo que ainda apresenta dificuldades em ser padronizado.

Quanto ao modelo para atual 'padrão ouro' para testar a susceptibilidade às drogas do *M. leprae* baseia-se no método complicado e demorado de aplicação dos bacilos em patas de camundongos, e tratamento do animal com a droga teste. Esse ensaio é realizado em poucos laboratórios e pode levar até um ano para revelar o resultado (WILLIAMS; GILLIS, 2004). Dessa forma a pesquisa de novos fármacos e pesquisas sobre a resistência do bacilo às drogas é limitada pela dificuldade do cultivo em laboratório da micobactéria.

Objetivo

Padronizar e avaliar a aplicação do modelo de cultura organotípica de pele para o cultivo do *M. leprae*.

Objetivos específicos:

- Avaliar a viabilidade do M. leprae inoculado no modelo hOSEC;
- Analisar as modificações histológicas da pele durante o seguimento de cultivo;
- Avaliar a capacidade do *M. leprae* de se multiplicar no modelo hOSEC por até 60 dias.

- Confirmar a viabilidade e capacidade de multiplicação bacilar após o cultivo *ex vivo* (hOSEC) pelo modelo *in vivo* de Shepard em camundongos nude.

2.1 Aspectos Éticos, humano e animal

Este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (n°1744888 / 2016) e pelo Comitê de Ética no uso do animal na Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (n° 026 / 2015-1) (Anexo 1 e 2).

Os doadores de pele foram informados sobre o estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico, para permitir o uso da pele que seria descartada (resíduo biológico).

2.2 Cultura Organotípica de Explante de Pele Humana – (hOSEC-*Human Organotypic Skin Explant Culture*)

Fragmentos de pele humana, saudáveis, descartados de cirurgias plásticas (abdominoplastia), logo que excisados foram colocados em um recipiente de vidro estéril, fechado hermeticamente e mantido em caixa térmica para ser transportado do centro cirúrgico até o laboratório.

No laboratório, para descontaminação, o fragmento foi mantido à 4°C na geladeira overnight (18h à 20h) em solução de PBS (tampão fosfato-salino) e 1,5% de antibiótico/antimicótico (penicilina 100U/ml, estreptomicina 100 mg/ml, Gibco[®] - Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, USA).

A manipulação da peça de tecido foi realizada dentro de fluxo lâminar em condições assépticas. Após o tempo de descontaminação, o tecido foi transferido do frasco com PBS para outro recipiente, e o tecido gorduroso subcutâneo foi retirado com o auxílio de uma tesoura curva e de uma pinça (Figura 2), então a pele (derme-epiderme) foi fragmentada em círculos de 0,8 cm de diâmetro, com o auxílio de um *punch* cirúrgico, assim os fragmentos de pele estavam prontos para receberem os inóculos e/ou serem posicionados da placa de cultura.

Na placa de cultura eles foram posicionados com o lado dérmico sobre papel filtro (80 g/m², permeabilidade ao ar 26 l/s m², porosidade 25 µm) apoiados em grades metálicas (ácido inoxidável) dentro do poço de placas de cultura de 6 poços, cada grade comportou 3 fragmentos. Meio de cultura *Dubelcco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Gibco[®]- Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco[®]- Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, USA), 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich, Germany) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (GIBCO - Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, USA), 1% L-glutamine (Sigma-Aldrich, Germany) e 1% de solução antibiótica/antimicótica (GIBCO - Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, USA), foi adicionado ao poço da placa de forma que o volume (5 mL) não ultrapassasse a altura da derme, mantendo a epiderme acima da interface meio/ar. As placas com os fragmentos foram mantidas em incubadora à 37° e 5% de CO₂. As trocas de meio foram realizadas a cada 3 dias, quando 3 mL do meio antigo era retirando e 3 mL de meio fresco adicionado (Figura 3).



Figura 2 - Pele usada para a montagem do hOSEC

Fragmento de pele obtida de abdominoplastia, usada para hOSEC. Em (A) tecido antes da remoção do tecido subcutâneo. Em (B) seta vermelha indica a pele ainda com camada de tecido adiposo e seta azul indica a pele após retirada de todo o tecido adiposo, mantendo derme e epiderme.
Figura 3 - Placa de cultura com o hOSEC



Placa de cultura com explantes de pele (0,8 cm de diâmetro) sobre papel filtro, grades metálicas e meio DMEM.

2.3 Obtenção do Mycobacterium leprae

M. leprae, cepa Thai-53, mantido em contínuas passagem em camundongo nude atímico (NU-Foxn1nu), da colônia do Instituto Lauro de Souza Lima, em Bauru, São Paulo, Brasil, foram isoladas como descrito por Trombone, et al. (2014) com algumas modificações. Resumidamente, o *M. leprae* foi extraído a partir do coxim plantar de camundongos nude machos, mantidos com o inoculo durante 6 meses no biotério apropriado. Após eutanásia com CO₂, as patas traseiras foram removidas e limpas com etanol a 70% e solução de etanol iodado 2% para descontaminação da superfície (Figura 4). Em uma placa de *petri*, com auxílio de tesoura e lâmina de bisturi, a epiderme e o tecido ósseo foram descartados e o tecido altamente bacilífero cortado em pequenos pedaços e transferido para um tubo de 5 mL e macerado com 2 mL de Solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS) usando um homogeneizador de tecido (Tissue Homogenizer Omni TH[®]). Durante o processo, o tubo foi mantido em gelo para evitar o aquecimento da amostra. Os detritos teciduais foram removidos passando-os através de um filtro celular de 40 µm (Falcon[®]) e a suspensão rica em bacilos foi obtida.

Uma alíquota desta suspensão foi usada para calcular o número de bacilos / mL (coloração de Ziehl-Neelsen), e para determinação de viabilidade (Live/Dead BacLight Viabilidade Bacteriana, ThermoFisher Scientific, cat: L7007). A suspensão bacilar foi mantida em solução HBSS com antibiótico/antimicótico (1% penicilina/estreptomicina) em microtubo de criopreservação lacrado com plástico parafilme e refrigerada até o momento da inoculação, que foi realizada no máximo 24h após a extração.



Figura 4 - Camundongo nude – Extração de bacilos do coxim plantar

Camundongo nude após eutanásia, posicionado dentro de fluxo lâminar, para a remoção do coxim das patas traseiras e obtenção de bacilos.

2.4 Coloração de Ziehl-Neelsen

Dez µl de suspensão foram colocados em lâminas de vidro (previamente marcadas com três círculos) acrescidos de 5 µl de solução de fenol / soro (5% de fenol, 2% de SBF em água destilada), homogeneizados e distribuídos uniformemente dentro da área do círculo, após a suspensão secar em temperatura ambiente, a lâmina foi passada 3 vezes em chama para fixação do material. O corante Fucsina Fenicada (NewProv, Pinhais, PR, Brasil) foi adicionado por 20 min, em seguida a lâmina foi enxaguada em água corrente e descorada em solução álcool-ácido a 1%

(1% de ácido clorídrico em etanol), até que o corte ficasse levemente róseo, então a lâmina foi lavada em água corrente e mergulhada por poucos segundos em solução de azul de metileno (NewProv, Pinhais, PR, Brasil) para contra coloração. Após a lâmina seca, a análise foi realizada em objetiva de 100x com óleo de imersão, em microscópio ótico LEICA® DM-4000B (Leica Microsystems, Alemanha). O cálculo de bacilos álcool ácidos resistentes / mL (BAAR/mL) foi feito de acordo com Trombone et al. (2014), contando todos os bacilos de 20 campos de cada esfregaço (3), total de 60 campos, a média foi utilizada na seguinte fórmula:

(Média de bacilo por campos contados) x (diluição da amostra no esfregaço) x (fator de correção¹).

2.5 Ensaio de Viabilidade do Mycobacterium leprae purificado em suspensão

A viabilidade do *M. leprae* em suspensão foi verificada antes da inoculação, utilizando o kit *BacLight Bacterial Viability* (Invitrogen; Molecular Probes, cat: L7012). Todo o procedimento foi realizado em ambiente com luz reduzida, seguindo as orientações da bula do kit, para 200 μ L de suspensão de bacilos, foram adicionados 3,6 μ L de A' e 6 μ L de B', que foram preparados da seguinte forma: A'- 1 μ L da solução A + 9 μ L de salina e B'- 1 μ L da solução B + 19 μ L de salina. A suspensão foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente no escuro, centrifugada a 12000rpm por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 15 μ L de glicerol 10% (diluído em salina), 8 μ L foi pipetado em uma lâmina e coberto com lamínula. A análise de porcentagem de bacilos viáveis foi feita em microscópio de fluorescência (LEICA® DMI-4000 B, Leica Microsystems, Alemanha) avaliando as duas colorações fluorescentes, verde (Syto 9 - Sy) para bacilos viáveis, e vermelho (iodeto de propídio - PI) para bacilos inviáveis, como descrito por Trombone, et al. (2014).

¹valor específico para cada microscópio usado para a leitura

2.6 Inoculação no modelo hOSEC e cultivo

Antes da inoculação a viabilidade foi verificada como descrito anteriormente, e uma alíquota da suspensão foi direcionada para teste de crescimento de microrganismos contaminantes, em meio *Brain Heart Infusion* (BHI) (por 24 - 48 horas a 37 °C) e meio Sabouraud (incubação a 37 °C por 30 dias), tanto sólido como líquido, sob condições aeróbias, anaeróbicas e microaerofílica, que foi realizado no laboratório de microbiologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP (Prof. Dr. Sérgio Luiz de Souza Salvador) (Figura 5).

Os explantes de pele (0,8 cm) foram divididos em 3 grupos: (a) inoculado com *M. leprae* viável (MLV), (b) inoculado com *M. leprae* inviável (MLI) e (c) inoculado com solução salina (NaCl 0,9%, diluente de suspensão bacilar). Os bacilos inviáveis foram obtidos por autoclavagem (autoclave a 121 ° C por 40 min) de alíquota da mesma suspensão dos bacilos viáveis.

A suspensão bacilar da pata do camundongo nude foi utilizada quando apresentou viabilidade acima de 86%, e a concentração do inóculo (viável e inviável) foi realizada após a análise de viabilidade e considerando o número de bacilos viáveis, de forma que a alíquota da suspenção direcionada para autoclavagem foi diluída da mesma forma que a alíquota MLV.



Figura 5 – Controle microbiológico.

Placas e frascos de cultura com os meios usados para o controle microbiológico das suspensões bacilares obtidas dos camundongos nude. Meios sólidos (A) e meio líquido (B).

A inoculação nos explantes previamente cortados (*punch* 0,8cm) foi realizada intradérmica utilizando uma microseringa Hamilton[®] (Hamilton Company- US Reno, Nevada) e com o auxílio de uma pinça fina (Figura 6), 25 μ l / explante, com 1,5x 10⁴ bacilos (viável ou inviável), ou solução salina, foram injetados. Os explantes receberam o inóculo antes de serem colocados nas placas de cultura.



Figura 6 – Processo de Inoculação dos explantes de pele.

As placas foram mantidas na incubadora a 37°C com 5% de CO₂, a cada 3 dias, 3 mL de meio de cultura antigo foram substituídos por meio fresco. Em dias predeterminados, zero, quatro, sete, quatorze, vinte e oito, e sessenta (D0, D4, D7, D14, D28 e D60) após a inoculação, explantes de cada condição, foram removidos da placa de cultura para análise, da seguinte forma: três fragmentos foram colocados no reagente TRIzol[®] (Invitrogen[®], cat .: 15596018) para

análise de biologia molecular, três foram colocados em formalina a 3,7%, para análise histológica, e em D28 e D60, além dos fragmentos para histologia e biologia molecular, três fragmentos foram removidos para inoculação in vivo (camundongo nude).

2.7 Estudo Histomorfológico

Após os tempos experimentais os fragmentos foram fixados em solução de formalina a 3,7% [solução comercial formalina 37% (Synth, LabSynth - Diadema, Brasil), diluída 10x em água destilada] durante 24 horas, posteriormente transferidos para álcool 70%, onde ficaram até o dia da inclusão em parafina, quando passaram em uma bateria de desidratação: álcool 80%, 90% e 95%, 50 min em cada; álcool absoluto I, II e III, 1 hora em cada; solução álcool-xilol (1:1) *overnight*; xilol I por 1 hora, e xilol II por 30 min; parafina à 60°C por 2h; então os fragmentos foram cortados ao meio e emblocados em cassetes próprios com parafina, de forma que a face interna do explante (região central) ficasse voltada para a face de microsecção do bloco.

Foram realizados cortes de 4 μm de espessura em lâminas comuns de histologia para a coloração HE, com hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha) e eosina (Vetec Química Fina LTDA, Rio de Janeiro, BR), e coloração de Fite-Faraco.

2.7.1 Coloração Hematoxilina e Eosina (HE)

Primeiramente, as lâminas foram deixadas em estufa 60°C para que a parafina dos cortes escorresse, por 2h, após isso as lâminas passaram por bateria de desparafinização em xilol I, II e III (Synth, LabSynth - Diadema, Brasil) e mistura álcool absoluto + xilol (1/1) 2 min cada; hidratação em uma sequência de álcoois, absoluto I e II, álcool 95%, 70%, 50% (Synth, LabSynth - Diadema, Brasil) 2 mim em cada um, 5 mim em água corrente e 2 enxágues em água destilada; e coradas em hematoxilina por aproximadamente 5 min, lavadas em água corrente por 5 min, 1

enxágue em água destilada e um mergulho em álcool 80%, e em eosina por aproximadamente 1 min. Para a montagem, a lâmina foi passada em álcool 70%, álcool 95%, álcool absoluto I e II, mistura álcool absoluto + xilol (1/1), xilol I e xilol II, e então a lamínula foi fixada com meio de montagem *Entellan* (Merck[®], Darmstadt, Alemanha).

A análise e imagens foram realizadas em microscópio ótico LEICA® DM-4000B (Leica Microsystems, Alemanha) equipado com uma câmera LEICA DFC® 280 (Leica Microsystems, Germany) para captura das imagens histológicas. Pelo software Leica Aplication Suite (LAS) versão 3.2.0, as imagens foram calibradas, e as montagens para os painéis obtidas usando a ferramenta *Stretch Image*.

2.7.2 Coloração Fite-Faraco

Para a observação do bacilo utilizou-se a coloração de Fite-Faraco. As lâminas foram incubadas a 60°C por 2 horas para escorrer a parafina, seguida por incubação em terebentina (Acrilex®, Batistini, SP, Brasil) por 15 min, e lavadas extensivamente em água corrente, levemente secas com papel filtro e então coradas com passos semelhantes do protocolo de Ziehl-Neelsen: os cortes foram cobertos com corante fucsina fenicada (NewProv, Pinhais, PR, Brasil) por 20 min, descoradas com solução álcool-ácido a 1% e mergulhadas em solução de azul de metileno (NewProv, Pinhais, PR, Brasil) para contra coloração, e lavadas em água corrente. Após tempo para secagem do excesso de água, as lâminas foram diafanizadas com passagens de 10 segundos em álcool absoluto, 30 segundos em xilol I, mantidas em xilol II por pelo menos 30 segundos, e montadas com Entellan® (Merck, Alemanha). A análise foi realizada em microscópio ótico LEICA® DM-4000B (Leica Microsystems, Alemanha), com objetiva de 100x com óleo de imersão. Os bacilos foram analisados quanto à sua morfologia, íntegros ou fragmentados, ao longo de todo o corte, e 100 campos centrais foram escolhidos para contagem dos bacilos.

2.8 Estudo Molecular

2.8.1 RNA

2.8.1.2 Extração de RNA total dos explantes

Os explantes direcionados para análise molecular foram retirados da cultura e imediatamente transferidos para microtubo contendo 1 mL de TRIzol[®] Reagente (Invitrogen. Cat.: 15596026) e levados para freezer -80°C, onde foram mantidos até o processamento.

Para a primeira etapa da extração, maceração mecânica do explante de pele, foram realizadas algumas tentativas diferentes para atingir a dissociação total do tecido. Foram usamos 3 protocolos (Figura 7):

- a) TissueLyser: em um microtubo de 2 mL o fragmento foi colocado inteiro, ou em pedaços menores feitos com o auxílio de uma lâmina de bisturi, a este adicionou-se 1 bead metálica de 5mm e 1 mL de trizol. Os tubos foram colocados no aparelho TissueLyser (Qiagen) e realizados 3 ciclos de 50 hzt por 3 ou 4 min, entre os ciclos os tubos foram deixados no gelo para resfriar a amostra;
- b) FastPrep[®]: o fragmento foi picotado com lâmina de bisturi e adicionado em tubo FastPrep[®] com 1 mL de trizol. O tubo foi acondicionado no aparelho FastPrep[®] (MP Biomedicals) e submetido a ciclagem de 6,5 m/s por 45 segundos;
- c) Homogeneizador de tecidos Omni TH[®]: o fragmento foi dividido ao meio e cada metade colocada em tubo de 4 mL com 1 mL de TRIzol[®], usando o homogeneizador de tecidos (Tissue Homogenizer Omni TH[®]) com a probe de 7 mm serrilhada, foram realizados 3 ou 4 ciclos de 15 segundos na velocidade máxima de rotação, com o tubo sempre imerso no gelo.

Figura 7 - Equipamentos utilizados nos testes de dissociação mecânica dos explantes de pele.



Equipamentos utilizados nos testes de dissociação mecânica do explante de pele para extração de ácidos nucléicos. (A) TissueLyser (Qiagen), (B) FastPrep[®] (MP Biomedicals) e (C) Omni homogeneizador de tecidos (Omni TH[®]).

Após os testes iniciais, o protocolo de dissociação mecânica com melhor eficiência na maceração dos explantes foi o (c), utilizando o aparelho Omni homogeneizador de tecidos (Omni TH[®]), e seguiu como descrito abaixo.

Para o processamento da amostra e extração de RNA, todo material utilizado foi lavado com água DEPC (Diethyl Pyrocarbonate, Sigma-Aldrich, cat.: D5758) ativa, seguida por água DEPC inativa (inativação realizada por autoclavagem). A mesma probe foi usada para todo o material, sendo que a cada fragmento macerado a probe foi limpa com álcool 70%, seguida de água DEPC ativa e por último, água DEPC inativa, e procurou-se macerar os grupos em dias diferentes para evitar contaminação entre eles. Cada fragmento foi dividido em duas partes e cada parte macerada em 1 mL de TRIzol[®] na velocidade máxima do homogeneizador (35.000 rpm), sendo o tubo sempre mantido imerso no gelo para evitar aquecimento da amostra. Após a maceração o tubo seguiu para a próxima etapa da extração de RNA, ou foi acondicionado em freezer -80^oC até ser processado.

Na etapa seguinte cada microtubo contendo 1 mL de macerado recebeu 200 µL de clorofórmio (J.T Baker. Cat.: 9180-02) gelado e foi misturado com intensa agitação manual por 15 segundos, seguido por centrifugação a 12000 rpm, à 4°C, por 15 min. Após a centrifugação a

fase aquosa, parte superior, foi transferida para um novo microtubo (a fase orgânica, interface e fenol-clorofórmio, foi reservada para extração de DNA) e a ele adicionado 500 μL de isopropanol gelado. Em seguida o microtubo foi mantido em -80°C por aproximadamente 24h para precipitação do RNA, após isso as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm, a 4°C, por 10 min, o sobrenadante descartado, e o *pellet* resultante lavado com 1 mL de álcool 75% gelado, com centrifugação a 7500 rpm, 4°C por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi retirado e o microtubo com a tampa aberta mantido em temperatura ambiente, por aproximadamente 15 minutos, para o *pellet* de RNA secar, após seco foi eluído em 15 μL de água DEPC. O RNA extraído foi acondicionado em freezer -80°C. Ao final, foram obtidos 2 tubos por amostra, cada um com volume de 15 μL, que após eluição foram unidos dando origem a 1 tubo com 30 μL.

2.8.1.2 Quantificação e avaliação de integridade do RNA

Após pelo menos um dia da extração o RNA foi quantificado em NanoVue[®] Plus (GE Healthcare Life Sciences) usando 2 μ L. Além da quantificação em ng/ μ L foram obtidas também as razões 260/280, 230/280. Para definir quantidade total de RNA por fragmento, após obter a quantificação, dada em ng/ μ L, o valor foi multiplicado pelo volume total de cada amostra.

O gel de agarose, para avaliar a integridade do RNA, foi realizado para algumas amostras. O gel foi confeccionado a 1,5%, utilizando 300 ng de cada RNA + 2 μ L de xileno cianol + 1 μ L de gel red, a eletroforese aconteceu sob 70V, por 1hora. E o resultado foi conferido em transluminador de luz UV.

2.8.1.3 Tratamento com DNase e síntese de cDNA

O RNA foi tratado com enzima DNase para garantir que a amostra de RNA não estivesse contaminada com DNA. Seguiu-se o protocolo da bula do kit RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA, cat.: M6101), para cada 1000ng de RNA 1 unidade de enzima foi utilizada, após homogeneização da amostra com a enzima e o tampão por pipetagem, o tubo foi incubado por 30 min a 37°C, após esta incubação cada amostra recebeu 1 μL de solução stop, e foi incubado novamente por 5 min a 65°C.

Após tratamento com DNAse as amostras foram quantificadas novamente em Nanovue[®], e 500 ng do RNA foi utilizado para síntese de cDNA, seguindo orientações do kit GoScript[™] Reverse Transcriptase System (Promega, USA, cat.: A5001), os 500 ng de RNA foram inicialmente incubados com 1 µL de Random Primers, em um volume final de 5 µL, à temperatura de 70°C por 5min, a este foram adicionados 15 µL de mix contendo 4 µL de tampão [5x], 2,4 µL de MgCl₂ [25mM], 1 µL de mix de nucleotídeos [10mM], 0,5 µL de RNasin [40u/µL], 1 µL de Transcriptase Reversa, e 6,1 µL de água Nuclease-free, após homogeneização por pipetagem o tubo foi incubado a 25°C por 5min, 42°C por 1 hora e 70°C por 15min.

Todas etapas de incubação foram realizadas em termociclador T100 thermal cycler da Bio-Rad (BioRad Laboratories, USA. Cat.: 1861096).

2.8.1.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de cDNA foram submetidas a PCR com *primers* específicos para a região 16S ribossomal (16S rRNA) e para proteína envolvida na fissão binária, ftsZ (Filamentous temperature-sensitive mutant Z) do *M. leprae*, e para os alvos humanos 18S rRNA (18S ribossomal) e TGF-β (fator de transformação do crescimento beta) (Life Technologies, Carlsbad City, CA, USA), a sequência de cada *primer* é mostrada da Tabela 1:

Alvo	Sequência	TM	Referência	
16S rRNA	5' TCGAACGGAAAGGTCTCTAAAAAATC 3'	920C	MAHANITY at al. 2016	
	5'CCTGCACCGCAAAAAGCTTTCC 3'	83-C	MARANTI et al., 2010	
FtsZ	5'GCCGAAATCGCTATCAACTC 3'	80%	-	
	5' ACAGTGACCCGTACCTCGTC 3'	89-0		
18S rRNA	5' GTAACCCGTTGAACCCCATT 3'	8300	RHO et al., 2010	
	5' CCATCCAATCGGTAGTAGCG 3'	8 3 -C		
TGF-β	5' ACATCAACGCAGGGTTCACT 3'			
	5' GAAGTTGGCATGGTAGCCC 3'	88ºC	NEGERA et al., 2018	
	5'GCTGGTTATCTCTCAG CTCCA 3'			

Tabela 1- Sequência de primers usados para amplificação de cDNA

As reações foram realizadas com Master Mix SYBR Green (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, USA, cat.: A6002), a amostra foi misturada com 12,5 μ L de Master Mix [2x], 0,5 μ L de cada primer [10 μ M] e 6,5 μ L de água nuclease-free, as amostras de cDNA foram usadas na diluição [1:5], sendo que para as reações com 16S rRNA foram usados 2,5 μ L e para as demais reações 5 μ L. As amostras foram avaliadas em triplicata e a concentração dos *primers* e da amostra foram definidas após testes.

A reação de PCR foi realizada no termociclador CFX96[™] Real-Time PCR Detection Systems (BioRad, sistema CFX96[™] Touch, EUA. Cat.: 184-5096) com os seguintes protocolos de ciclagem:

- a) 16S rRNA uma temperatura inicial de 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 94°C por 2 min, 60°C por 2 min e 72°C por 3 min, e um último passo à 72°C por 10 min, ao final a última etapa foi a curva de *melting*, processada com incrementos de 0,5°C, de 55°C a 95°C;
- b) FtsZ uma temperatura inicial de 95°C por 2 min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 5 seg, 64°C por 10seg e 72°C por 20seg, e ao final a última etapa foi a curva de *melting*, processada com incrementos de 0,5°C, de 50°C a 90°C;
- c) 18S rRNA uma temperatura inicial de 95°C por 2 min, seguido por 38 ciclos de 95°C por 15seg e 60°C por 1 min, ao final a última etapa foi a curva de *melting*, processada com incrementos de 0,5°C, de 65°C a 95°C;

d) TGF-β - uma temperatura inicial de 95°C por 2 min, seguido por 45 ciclos de 95°C por 5 seg e 60°C por 10 seg e 72°C por 20seg, ao final a última etapa foi a curva de *melting*, processada com incrementos de 0,5°C, de 65°C a 95°C.

Em todas as reações foram usados os controles:

- a) NT (no template) tubo com todos reagentes da reação de PCR exceto amostra de cDNA;
- b) NRT (no reverse transcriptase) tubo com todos os reagentes da reação de PCR e amostra de RNA que na etapa de síntese de cDNA foi incubado com todos os reagentes da síntese exceto a enzima transcriptase.

DNA extraído de *M. leprae* isolado de camundongo nude foi utilizado como controle positivo para amplificação do 16S rRNA.

Após o término da reação o arquivo gerado foi exportado para pen drive e analisado no *software* do aparelho termociclador (Bio-Rad CFX Manager 2.1. 1022.05.23), o *threshold* ajustado e os *cycle threshold* (cT) das amostras determinados, a amplificação foi considerada positiva quando apresentava curva de amplificação com TM (temperatura de *melting*) igual ao controle.

2.8.1.4.1 Sequência dos Primers FtsZ

O par de *primers* para a região gênica ftsZ responsável pela sínteses da proteína FtsZ (Filamentous temperature-sensitive mutant Z) envolvida na fissão binária da micobacteria, foi desenhado a partir de sequência referência (<u>https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/909912</u>) usando o *software* Primer3 versão 4.0 (<u>http://frodo.wi.mit.edu/primer3</u>). As sequências obtidas foram testadas e validadas *in silico* quanto especificidade pelas ferramentas do programa BLAST: BLASTn

 (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LO

 C=blasthome)
 e
 Primer-BLAST
 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer

 blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHome)
 do banco de dados do NCBI.

In vitro os *primers* foram testados com reagentes e protocolo citados na seção anterior, usando amostras de DNA e cDNA de suspensão de bacilos *M. leprae*, e DNA e cDNA de tecido humano sem inóculo, e a temperatura ideal de anelamento foi testada em PCR gradiente com temperaturas de 50ºC a 65,2ºC.

2.8.2 DNA

2.8.2.1 Extração de DNA

Com a fase reservada da extração de RNA (fase interface e fenol-clorofórmio), a extração de DNA seguiu com a adição de 500 μ L de tampão de extração (Tiocianato de Guanidina [4M] + Citrato de Sódio [50mM] + TrisBase [1M]) e intensa agitação manual por 3 minutos, seguido por centrifugação a 12000 rpm, por 30 minutos sem refrigeração. A parte superior, fase aquosa, foi transferida para novo microtubo e a ela adicionado 400 μ L de isopropanol, essa mistura foi incubada em geladeira por aproximadamente 24h, seguido por centrifugação de 12000 rpm a 4°C por 15minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com 500 μ L de álcool 70%, seguido de centrifugação a 12000 rpm, a 4°C, por 15 minutos. O álcool foi desprezado e o *pellet* após seco foi eluído com 15 μ L de tampão TE pH 8,0 (Tris-HCI [1M] e EDTA [0.1M]). Ao final os dois tubos de cada amostra foram unidos, dando origem a 1 tubo por amostra com volume total de 30 μ L. O material foi acondicionado em freezer -20°C.

Após quantificações e testes para checar a qualidade do DNA, uma etapa de purificação foi acrescentada.

As amostras foram descongeladas e receberam 1 mL de isopropanol, os tubos foram acondicionados em freezer -20°C por 4 dias, quando então foram centrifugados à 12000rpm, 4°C por 15min. O sobrenadante foi desprezado, 1 mL de álcool 70% foi adicionado e após leve homogeneização manual o tubo foi centrifugado novamente à 12000rpm, 4°C por 15min. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* seco à temperatura ambiente e ressuspenso em 20 µL água

para biologia molecular (Sigma Aldrich, cat.: W4502). As amostras foram acondicionadas em - 20°C.

2.8.2.2 Quantificação de DNA

A quantificação das amostras de DNA foi realizada em 3 equipamentos diferentes: NanoDrop[®] (Uniscience – ND1000V381), Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen) e NanoVue[®] Plus (GE Healthcare Life Sciences), os dois primeiros equipamentos utilizados no laboratório de Hanseníase da FioCruz-RJ.

Nos equipamentos NanoDrop e NanoVue foram utilizados 2 μ L de amostra diretamente no sensor. Para o Qubit, 2 μ L de amostra foram misturados com 198 μ L do reagente específico do aparelho (199 μ L tampão de diluição + 1 μ L de reagente A). Os valores foram obtidos em ng/uL.

2.8.2.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras de DNA foram submetidas a PCR com *primers* específicos para a região RLEP (elemento de repetição) do bacilo, e para o gene humano GAPDH (*Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*) (Tabela 2).

Tabela 2 - Sequê	ncia de <i>primers</i>	usados para	amplificação	de DNA
------------------	------------------------	-------------	--------------	--------

Alvo	Sequência	TM	Referência
RLEP	5' ATTTCTGCCGCTGGTATCGGT 3'	88ºC	AZEVEDO et al., 2016
	5' TGCGCTA-GAAGGTTGCCGTAT 3'		
GAPDH	5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3'	81ºC	VANDESOMPELE et al., 2002
	5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'		

Todas as amostras de DNA, após quantificação em NanoVue, foram diluídas para 7ng/uL, e 5 μ L foram misturados com 12,5 μ L de Master Mix SYBR Green [2x] (GoTaq qPCR Master Mix, Promega, USA, cat.: A6002), 0,5 μ L de cada primer [10 μ M] e 6,5 μ L de água nuclease-free. As amostras foram avaliadas em triplicata, e a concentração dos *primers* e da amostra foram definidas após testes.

As reações de PCR foram realizadas no termociclador CFX96[™] Real-Time PCR Detection Systems (BioRad, sistema CFX96[®] Touch, EUA. Cat.: 184-5096) com os seguintes protocolos de ciclagem:

- a) RLEP uma temperatura inicial de 95°C por 2 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 seg e 62,5°C por 30 seg e 72°C por 1 min, ao final a última etapa foi a curva de *melting*, processada com incrementos de 0,5°C, de 60°C a 95°C;
- b) GAPDH uma temperatura inicial de 95°C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 95°C por 5 seg e 62°C por 10 seg, ao final a última etapa foi a curva de *melting*, processada com incrementos de 0,5°C, de 55°C a 95°C.

Após o término da reação o arquivo gerado foi exportado para pen-drive e analisado no *software* do aparelho termociclador (Bio-Rad CFX Manager 2.1. 1022.05.23), o *threshold* ajustado e os cT das amostras determinados, a amplificação foi considerada positiva quando apresentava curva de amplificação com TM igual ao controle.

2.8.3 Análise das PCRs – Expressão gênica e Viabilidade

A análise de viabilidade do *M. leprae* pelo 16S rRNA, foi realizada avaliando a detecção ou não do *amplicon*, considerando positiva a amostra com C_T (do inglês *threshold cycle*, limiar do ciclo) abaixo de 40.

O método de Livak e Schmittgen (2001) usando a fórmula $2^{\Delta CT}$ foi usado para calcular a viabilidade e expressão gênica relativa. Inicialmente o ΔCT foi calculado subtraindo o valor de C_T do gene alvo do valor de C_T do gene referência, e o valor de ΔCT obtido aplicado na fórmula $2^{\Delta CT}$.

A expressão gênica relativa de TGF-β, foi obtida usando o 18S rRNA como gene de referência. E a viabilidade relativa foi baseada na relação entre cDNA/DNA, usando o gene GAPDH (DNA) como referência para estimar a viabilidade relativa dos explantes pela expressão do 18S rRNA (cDNA), e para viabilidade relativa bacilar o gene RLEP (DNA) usado como referência para a expressão do 16S rRNA (cDNA).

2.9 Recuperação de bacilos do hOSEC

Após os tempos de 28 e 60 dias em cultura no hOSEC os bacilos foram recuperados dos explantes, em triplicatas de cada repetição. Todo o processo foi realizado com material estéril e em fluxo lâminar.

O fragmento foi retirado da placa de cultura e transferido para tubo de 4 mL contendo 1 mL de solução salina, e macerado usando o homogeneizador de tecido (Figura 7c), com velocidade 4, e 3 ciclos de aproximadamente 15 segundos, mantendo o tubo sempre em gelo, para evitar aquecimento da amostra. O macerado foi filtrado em *cell strainer* de 40 μM (Falcon[®]) previamente umedecida com salina, o filtrado foi centrifugado a 12000rpm por 10min a 4°C, então o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso com 200 μL de solução salina e direcionado para inoculação.

2.10 Inoculação in vivo

A suspensão bacilar obtida dos explantes nos diferentes tempos, foi mantida em microtubo lacrado com plástico parafilme e refrigerada, até no máximo 24h, até o momento da inoculação.

A inoculação foi feita nas patas traseiras de camundongos nude machos, com idade de 6 a 8 semanas. Dentro do fluxo laminar foi feita a imobilização manual do animal, e com uma seringa de insulina, 30 μL da suspenção bacilar foram inoculados no coxim de cada pata traseira, as 2 patas do animal foram inoculadas, e a suspenção de cada fragmento foi dividida para 2, 3 ou 5 animais.

Os animais foram mantidos no biotério do Instituto Lauro de Souza Lima (ILSL – Bauru-SP) por 5 meses, quando então foram eutanasiados para análise das patas inoculadas. Uma das patas foi macerada para coloração de Ziehl-Neelsen e a outra dividida em duas partes, uma processada para análise histopatológica (coloração de HE e Fite-Faraco) e a outra transferida para RNAlater mantida em -80°C para posterior extração de RNA/DNA e realização de PCR, como descrito para os fragmentos em cultura (Seção 2.8).



Figura 8 - Caixa de camundongos nude dentro de fluxo lâminar onde são manipulados assepticamente.

2.11 Ensaio de aplicação de inóculos clínicos no modelo hOSEC

2.11.1 Indivíduos

Cinco pacientes (P) atendidos no ambulatório de Hanseníase do Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP foram selecionados para coleta de material para inoculação nos fragmentos.

Os indivíduos apresentavam quadro clínico compatível com polo lepromatoso da hanseníase e/ou falência/resistência ao tratamento. Os exames laboratoriais, baciloscopias e histopatológicos anteriores a coleta foram positivos.

2.11.2 Coleta de material

Foram coletadas biópsias de pele ou raspado dérmico dos respectivos pacientes.

Um paciente (P1) teve coleta de raspado dérmico, que foi coletado de quatro sítios (lóbulos das orelhas, cotovelo direito e joelho direito). O raspado dérmico foi realizado após incisão com lâmina de bisturi nº15, feita sob isquemia, o interior da incisão foi raspado com a face não cortante da lâmina e o material obtido transferido para microtubo contendo 1 mL de solução salina (NaCl 0,9%) com 1% de antibiótico/antimicótico (penicilina 100U/ml, estreptomicina 100 mg/ml, Gibco[®] - Invitrogen Corporation - Grand Island, NY, USA). O tubo foi mantido sob refrigeração até o momento do processamento.

Dos demais pacientes (P2, P3, P4, P5) foram coletadas biópsias de lesões, sob anestesia local, usando *punch* cirúrgico de 4mm, que foram realizadas em ambiente ambulatorial, por dermatologistas do serviço. Os fragmentos excisados foram colocados em microtubos secos e mantidas sob refrigeração até o momento do processamento.

2.11.3 Processamento das amostras clínicas e inoculação

O tubo com o raspado dérmico foi levado para o laboratório sob refrigeração, e centrifugado por 15 min à 12000rpm e 4ºC. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* adicionado 100 μL de solução salina (NaCl 0,9%), 10 μL foi retirado para montagem de lâmina de Ziehl-Neelsen, e 25 μL da suspenção foi inoculado, por fragmento, com agulha e seringa de insulina.

O fragmento antes do processamento foi descontaminado com solução salina (NaCl 0,9%) com 1% de antibiótico/antimicótico, então picotado com tesoura e transferido para tubo de 4 mL contendo 1 mL de solução salina, onde foi macerado usando o homogeneizador de tecido (Figura 7c), com velocidade 4, e 3 ciclos de aproximadamente 15 segundos, mantendo o tubo sempre em gelo. O macerado foi filtrado em *cell strainer* de 40 μM (Falcon[®]) previamente umedecida com salina, do filtrado 10 μL foi transferido para lâmina para coloração de Ziehl-Neelsen e o restante direcionado para inoculado nos explantes, logo após a extração.

Cada explante foi inoculado com 25 µL da suspensão obtida na extração, usando a microseringa, e acondicionados nas placas de cultura como descrito anteriormente para os outros explantes do trabalho (Seção 2.6).

Após os tempos de cultivos, entre 15 e 30 dias, os explantes foram retirados das placas de cultura e processados para as análises histopatológica e molecular, e para extração dos bacilos para inoculação *in vivo*, seguindo os mesmos protocolos descritos anteriormente.

2.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism 5, usando teste nãoparamétrico One-Way ANOVA seguida por Test Tukey, com intervalo de confiança de 95%, e os valores de p significantes foram: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Para confecção dos gráficos foi usado o GraphPad Prism 5, e Microsoft Excel 2016.

2.12 Descarte de Resíduos Biológicos

Todo o resíduo gerado nos experimentos foi descartado de forma adequada conforme Resolução RDC n° 306/2004 da ANVISA.

Os resíduos, grupo A1 (suspensão bacilar), grupo A2 (resíduos de tecidos de experimentação com inoculação de *M. leprae*) e grupo A4 (sobras de fragmentos de tecido humano, pele e tecido adiposo, saudáveis), primeiramente foram tratados com hipoclorito de sódio (NaClO 2%) e acondicionados em frascos que foram descartados em saco branco, e encaminhado para incineração.

3.1 Modelo hOSEC: padronização e ajustes

A cultura de explante de pele anteriormente usada no laboratório do grupo de Cicatrização e Hanseníase (Frade, et al. 2015; Andrade, et al. 2015), necessitou de alguns ajustes para padronização no uso como modelo para o cultivo de *M. leprae*.

A princípio, para a cultura em hOSEC, a pele obtida em cirurgia plástica era cortada em fragmentos de aproximadamente 1cm² com tesoura cirúrgica, e apenas um fragmento era colocado por grade e/ou por poço. Após testes preliminares concluiu-se que para o objetivo deste trabalho, os fragmentos deveriam ser menores viabilizando as análises, e que cada análise (histologia, biologia molecular, inoculação *in vivo*) deveria ser feita com um fragmento. Dessa forma, estabeleceu-se que os fragmentos para a cultura do *M. leprae* deveriam ter o tamanho de 0,8 cm de diâmetro que foram obtidos com *punch* cirúrgico de 0,8 cm, apresentando em média o peso de 0,12g.

Além do uso do *punch* facilitar as análises, pelo tamanho padronizado, com fragmentos menores, foi possível cultivar 3 fragmentos por poço na placa de cultura (Figura 9).



Figura 9 - Figura demonstrativa do hOSEC

Explantes de pele sobre grades metálicas em placa de cultura de 6 poços. (A) Método anterior, fragmentos retangulares de aproximadamente 1 cm² obtidos com uso de tesoura cirúrgica; (B) Método padronizado, mais eficiente, com fragmentos circulares obtidos com *punch* cirúrgico de 0,8 cm de diâmetro.

Inicialmente, a inoculação de volume, da suspensão de bacilos ou salina, era realizada com seringa de 1 mL e agulha de 13 x 0,45mm – 26 G1/2 (BD Plastipak, Brasil), porém observouse a dificuldade em fazer a inoculação padronizada com volume exato de 30 μ L em todos os fragmentos, o que consequentemente altera a quantidade de bacilos inoculados. Diante disso foi padronizado o uso de microseringa Hamilton[®] (Hamilton Company- US Reno, Nevada) de volume fixo de 25 μ L, com agulha adaptada de 13 x 0,45mm – 26 G1/2 (Figura 10), dessa forma os volumes e concentrações de bacilos inoculados nos fragmentos foram uniformizados.



Figura 10 - Imagem demonstrativa das seringas usadas para inoculação

(A) Seringa de 1 mL e agulha de 13 x 0,45mm – 26 G1/2, usada nas primeiras tentativas de inoculação. (B) Microseringa Hamilton[®] com agulha adaptada de 13 x 0,45mm – 26 G1/2, padronizada para a inoculação.

3.2 Caracterização da pele dos doadores

A pele utilizada nos experimentos discutidos neste trabalho, foi obtida de restos cirúrgicos de redução de pele de abdômen (abdominoplastia) de 4 doadores.

Entre os doadores foram 3 indivíduos do sexo feminino, brancas, com idades que variaram entre 41 a 56 anos: Pele 1 – 41 anos, Pele 2 - 56 anos e Pele 3 - 52 anos. A quarta pele foi obtida de doador do sexo masculino, branco, de 25 anos (Pele 4).

3.3 Análise dos explantes em cultura

À observação clínica, os explantes permaneceram com aparência saudável durante todo o período de cultura.

Do ponto de vista histológico, foi possível notar à coloração por HE, que a pele em cultura manteve sua estrutura natural até o 7º dia, muito similar ao início da cultura (D0) (Figura 11), mantendo todas as camadas da epiderme (basal, espinosa, granulosa e córnea) e sem alterações visíveis na junção dermo-epidérmica. Nos tempos subsequentes, de modo progressivo houve diminuição do número de camadas de queratinócitos, a epiderme se apresentou mais retificada e aumento importante da espessura da camada córnea, porém a junção dermo-epidérmica e a camada basal se mostraram regulares.

A derme papilar, formada por tecido conjuntivo frouxo, mostrou-se visível e facilmente notada até o 14º dia, a partir de 28º dia foi possível percebê-la mais densa, com delimitação menos perceptível, e as papilas dérmicas deixaram de ser acentuadas. Na derme reticular, no geral, observou-se aumento da espessura das fibras colágenas com diminuição dos espaços entre elas no 28º e principalmente no 60º dia, sendo possível notar células dispersas e estruturas de glândulas, vasos, músculos, filetes nervosos, e folículos pilosos, que foram observados ao longo de toda a cultura.

Essas observações histológicas foram semelhantes em todos os explantes das 4 peles, inoculados com MLV e com salina, sem alteração perceptível à essa análise entre os grupos.

Imagens representativas de duas peles diferentes (Pele 1 e Pele 3) e de explantes inoculados com MVL e Salina, podem ser observadas nas Figura 12 e Figura 13, respectivamente.





Cortes de explantes de pele (Pele 1) corados com hematoxilina e eosina. Nas colunas, da esquerda para direita, estão os tempos em cultura D0, D7, D14, D28 e D60. De cima para baixo são ampliações obtidas em objetivas de 10x, 20x e 40x. As imagens foram obtidas no software Leica Aplication Suite (LAS) versão 3.2.0, usando a ferramenta *Stretch Image*.



Figura 12 A - Histomorfologia dos explantes de dois indivíduos distintos ao longo do período de cultura

Comparação representativa de cortes histológicos da Pele 1 (acima) e Pele 3 (abaixo), corados com hematoxilina e eosina. (A) <u>Ampliação em objetiva de 10x</u>, (B) Ampliação em objetiva de 40x (na próxima página). Nas colunas, da esquerda para direita, estão os tempos em cultura D0, D28 e D60. As imagens foram obtidas no software Leica Aplication Suite (LAS) versão 3.2.0, usando a ferramenta *Stretch Image*.





(B)

Comparação representativa de cortes histológicos da Pele 1 (acima) e Pele 3 (abaixo), corados com hematoxilina e eosina. (A) Ampliação em objetiva de 10x (página anterior), (B) <u>Ampliação em objetiva de 40x.</u> Nas colunas, da esquerda para direita, estão os tempos em cultura D0, D28 e D60. As imagens foram obtidas no software Leica Aplication Suite (LAS) versão 3.2.0, usando a ferramenta *Stretch Image*.



Figura 13 A- Histomorfologia dos explantes inoculados com MLV e Salina ao longo do período de cultura D7 D28 D60

Comparação representativa de cortes histológicos da Pele 1, com inóculo Salina (SA) (acima) e MLV (abaixo), corados com hematoxilina e eosina. (A) <u>Ampliação em objetiva de 10x</u>, (B) Ampliação em objetiva de 40x (na próxima página). Nas colunas, da esquerda para direita, estão os tempos em cultura D7, D28 e D60. As imagens foram obtidas no software Leica Aplication Suite (LAS) versão 3.2.0, usando a ferramenta *Stretch Image*.





Comparação representativa de cortes histológicos da Pele 1, com inóculo Salina (SA) (acima) e MLV (abaixo), corados com hematoxilina e eosina. (A) Ampliação em objetiva de 10x (página anterior), (B) <u>Ampliação em objetiva de 40x.</u> Nas colunas, da esquerda para direita, estão os tempos em cultura D7, D28 e D60. As imagens foram obtidas no software Leica Aplication Suite (LAS) versão 3.2.0, usando a ferramenta *Stretch Image*.

3.4 Análise da suspensão bacilar para inoculação

Todas as suspensões bacilares utilizadas para a inoculação nos explantes apresentaram 86% ou 87% de viabilidade (Figura 14), e os testes de controle microbiológicos, para a identificação de possíveis microrganismos na suspensão obtida dos camundongos, realizada com alíquota separada previamente à inoculação dos explantes, mostrou ausência de contaminações em todas as suspensões utilizadas.



Figura 14 - Fotomicrografia do ensaio de Viabilidade de suspensão bacilar.

Imagem de suspensão de bacilos coradas com kit *BacLight Bacterial Viability*. Imagem obtida em microscópio de fluorescência (LEICA[®] DMI-4000 B) (objetiva de 63x). Em verde bacilos viáveis, e em vermelho bacilos inviáveis.

3.4 Análise dos explantes inoculados

Pelo fato de algumas diferenças metodológicas entre os experimentos realizados com pele feminina e o experimento com a pele masculina, os resultados foram mostrados separadamente, primeiro para as peles femininas e depois para masculina.

Os dados dos explantes, D60 da Pele2 inoculados com MLV e Salina, e dos explantes D4, D7 e D28 da Pele3 inoculados com Salina, não são apresentados nas análises devido a contaminação durante a cultura ou por delineamento experimental.

3.4.3. Pele Feminina

3.4.3.1. Histologia – Fite-Faraco

Os explantes foram processados para análise histológica com coloração específica para os bacilos (Fite-Faraco), e foi possível observar bacilos bem corados tanto nas amostras inoculadas com bacilos viáveis (MLV) como com bacilos inviáveis por autoclavagem (MLI). A princípio esperava-se poder contar os bacilos e estimar porcentagem de bacilos íntegros (vivos) e fragmentados (mortos) em cada corte e obter uma média para cada fragmento inoculado, e estimar uma curva para número de bacilos e morfologia/viabilidade ao longo da cultura, porém algumas observações foram feitas e nos levaram a discutir esse método de análise, a saber:

 a) Os fragmentos com o inóculo MLI apresentavam a grande maioria dos bacilos com morfologia íntegra – o que nos leva a questionar a afirmação de que bacilos íntegros são viáveis e que os fragmentados são inviáveis, frente à metodologia de inviabilização bacilar utilizada (autoclavagem); b) Algumas lâminas dos fragmentos DO apresentavam número de bacilos muito inferior ao esperado, além de uma discrepância notável entre as triplicatas e repetições de todos os tempos de cultivo, fato que nos fez pensar sobre a representatividade do corte realizado no fragmento para esta análise.

Diante desta discussão, optamos por fazer de forma representativa a contagem de bacilos em 100 campos escolhidos no corte de cada explante. O Gráfico 1 mostra o número de bacilos encontrados nos 100 campos analisados por explante, de cada tempo de cultura, nas 3 peles femininas utilizadas. Pode-se notar a variação no número de bacilos encontrados entre as triplicatas do mesmo grupo, assim não houve diferença estatística entre eles, exceto para os fragmentos de D28 da Pele 2, que apresentou diferença estatística em relação a todos os outros grupos avaliados.

Gráfico 1 - Distribuição do número de bacilos por explante durante a cultura



Número total de bacilos em 100 campos analisados de cada explante em cada tempo de cultura e nas distintas peles (3 peles de doadoras femininas). *p<0,05.

Os bacilos foram identificados por todas as regiões do corte, em menor número na epiderme, localizados na camada de queratinócitos e algumas vezes na camada córnea; e na grande maioria na derme, área de inoculação, desde a região superficial até profunda chegando até a base do explante (Figura 15).



Figura 15 – Bacilos nas diferentes regiões do explante.

Cortes histológicos de um explante com MVL, corado em Fite-Faraco, evidenciando bacilos na camada de queratinócitos (cabeça de seta), e regiões superficial e profunda da derme (seta). CC=Camada córnea, DS= Derme superficial, DP=Derme profunda. Aumento em objetiva de 100x.

Os bacilos observados nos cortes apresentaram variável morfologia, além dos categóricos bastonetes bem corados, muitas outras formas foram observadas, estruturas isoladas e menores, aglomerados de formas menores e irregulares, bastonetes isolados com coloração contínua ou com regiões descontínuas de granulação, e formações maiores com muitas formas distintas (Figura 15). As diversas formas encontradas em nossas amostras são formas muito semelhantes

as descritas em 1886 por Adolpho Lutz em suas observações realizadas em material de indivíduos doentes, como descrito na obra "Sobre a morfologia do microrganismo da lepra" (Lutz A. 2004) (Figura 17), e mais tarde por Paldrock A. (1923) e Souza-Araujo (1953) (Figura 16).





Imagens de bacilos identificados nos cortes dos explantes com MVL, (continua próxima página)

corados em Fite-Faraco, bacilos identificados em todas as diferentes peles, ao longo de todo o tempo de cultura. (a) bastonetes clássicos bem corados. (b) bastonetes com vacúolos, regiões menos coradas. (c) diplococos. (d) e (e) bacilos empilhados. (f) bastonetes com regiões continua de granulação. (g) cocos enfileirados. (h) estreptococos (i) bastonetes menores bem corados. (j) pontos de condensação. (k), (l), (m) e (n) aglomerados com diversas formas. (o) e (p) formas menores e irregulares. (q) globia. Fotos obtidas em aumento de objetiva de 1000x.

Figura 17 - Morfologia dos bacilos segundo Adolpho Lutz.



Ilustração retirada da obra "Sobre a morfologia do microrganismo da lepra". Adolpho Lutz - Obra Completa. Legenda de retirada da obra de origem: 1- Bastonetes com invólucro gelatinoso úmido. 2-Bastonetes com invólucro gelatinoso ressecado. 3, 4, 5- O mesmo conglomerado de bastonetes em estado úmido, meio ou totalmente ressecado. 6- Um conglomerado de bastonetes distinguíveis através da coloração de Gram e descoloração com álcool nítrico, com um grupo de pequenas esferas semelhantes a cocos. 7-Bastonetes que se podem distinguir com formas de ponto, cólon, 'i', estreptococos e Coccothrix. 8-Células de paredes espessas não coradas, isoladas e em conjunto. 9, 10 e 11- Células grandes que podem ser coradas com o corante de contraste, vistas isoladamente e na extremidade de bastonetes homogêneos ou descontínuos.


Figura 18 – Formas bacilares descritas por Paldrock e Souza-Araujo

Imagem retirada da publicação "Morfologia do *Mycobacterium leprae hominis* e do *M. leprae muris*. Estudo baseado na microscopia electrônica e de contraste de fases. Ilustração feita por A. Paldrock (Souza-Araujo, 1953).

3.4.3.2 Análise molecular

3.4.3.2.1 Extração e Quantificação de ácidos nucléicos

Para a extração do RNA/DNA total do fragmento foram testados 3 protocolos de maceração, com os seguintes resultados:

- a) TissueLyser: nas duas formas que foram testadas, fragmento inteiro e fragmento picotado, após vários ciclos de agitação em frequência máxima com a bead metálica, não houve a dissociação completa do tecido, além de gerar um aquecimento considerável na amostra;
- b) FastPrep[®]: os fragmentos submetidos a este protocolo foram parcialmente dissociados restando pedaços da pele ao final do ciclo;
- c) Homogeneizador de tecidos, Omni TH[®]: a dissociação do fragmento foi satisfatória nesse protocolo quando processado com a probe de 7mm, em rotação máxima, sendo que a divisão do fragmento em duas partes e cada metade processada em 1mL de reagente trizol foi mais eficiente.

Como entendemos que para obter análise mais fidedigna dos fragmentos a dissociação por completo do fragmento seria necessária, o protocolo usando o homogeneizador de tecidos (Tissue Homogenizer Omni TH[®]) foi selecionado para o processamento das amostras.

<u>A) RNA</u>

Ao final da extração as amostras foram quantificadas em Nanovue[®], e mais de 88% das amostras de RNA entre MLV, MLI e Salina, apresentaram a razão 260/280 acima de 1,7 (indicativo

de pureza, valores mais próximos de 2,0 indica maior pureza), sendo que a maioria foi 1,8 (Tabela3), todas as amostras foram usadas nas etapas seguintes.

Razão 260/280	% Explante MLV	% Explante MLI	% Explante Salina	Total de explantes (%)	
1,4	0	0	3	3 (2,2)	
1,5	0	1	4	5 (3,7)	
1,6	3	1	4	8 (5,9)	
1,7	18	9	11	38 (27,9)	
1,8	28	29	17	74 (54,4)	
1,9	6	2	0	8 (5,9)	
Total	55	42	39	136 (100)	

Tabela 3 - Razão entre as absorbâncias 260/280 das amostras de RNA

Razão das absorbâncias 260/280, indicativo de pureza, valores mais próximos de 2,0 indica maior pureza. Amostras de RNA extraído dos explantes das peles femininas, obtida na quantificação pelo equipamento NanoVue[®].

O gel de agarose para checar a qualidade/integridade do RNA foi realizado com algumas amostras, e pode ser observado na Figura 19. Todas as amostras avaliadas apresentaram as bandas referentes ao 18S e 28S RNA ribosomal humano, indicando integridade do RNA extraído.

Figura 19 - Fotodocumentação de gel de agarose para avaliação da integridade do RNA



Gel de agarose a 1,5%, com amostras de RNA extraído dos explantes de pele em tempos variados de cultura, setas mostrando as bandas 18S e 28S (RNA ribossomal humano).

Na Figura 20, pode-se observar a comparação das quantidades totais em nanogramas (ng) de RNA extraído dos explantes durante o período de cultura e entre as diferentes peles usadas.

A quantidade de RNA total diminuiu ao longo do tempo, de forma semelhante nos 3 grupos (MLV, MLI e salina), assim como nas peles diferentes. Embora o grupo Salina tenha apresentado quantidades um pouco acima dos outros dois grupos (MLI e MLV) (Figura 18), não houve diferenças estatísticas entre esses grupos quando avaliados dentro do mesmo tempo de cultura, as diferenças foram significativas apenas entre os tempos de forma semelhante para os grupos de inoculação, mostrando que os inóculos não influenciaram a quantidade total de RNA nos explantes, e apenas o tempo de cultura influenciou nesse dado.



Figura 20 - Quantificação de RNA total por grupo de tratamento em cada pele.

Média de RNA total (n=3 explantes) em nanogramas (ng) extraído dos explantes da Pele 1, Pele 2 e Pele 3, por grupo de tratamento (Salina, MLI e MLV) ao longo dos dias de cultura (Dias 0, 4, 7, 14, 28 e 60). Quantificação obtida pelo equipamento Nanovue[®]. Dados dos explantes D60 dos grupos MLV e Salina da Pele 2 ausentes (retirados do grupo devido contaminação), e do D4 e D7 dos grupos MLI e salina da Pele 3 ausentes (delineamento experimental).

Entre os tempos de cultivo os resultados foram semelhantes para as 3 peles, entre D0, D4 e D7 não houve diferença estatística, porém a partir de 14 dias, e progressivamente até 60 dias, a redução de RNA começa a ficar estatisticamente diferente dos tempos iniciais tanto para o grupo MLV quanto para salina (Gráfico 2).

Gráfico 2 - RNA total dos grupos MLV e Salina



RNA total em nanogramas (ng) extraído de explantes do grupo MLV e do grupo Salina, ao longo dos dias de cultura. *p< 0,05. ***p<0,001.

A avaliação da quantidade total de RNA dos explantes independente dos inóculos, mostra que não há diferença entre a Pele 2 e 3 em nenhum dos pontos de análise, entre a Pele 1 e 2 a diferença estatisticamente significativa foi nos tempos D0, D4, D7 e D28, e ente a Pele 1 e 3 houve diferença em D0, D7, D14 e D28 (Gráfico 3).





Média de RNA total (n= explantes dos 3 grupos, MLV + MLI + salina) em nanogramas (ng), extraído dos explantes das 3 peles, ao longo dos dias de cultura (D0, D4, D7, D14, D28 e D60) e a respectiva média das peles. Quantificação obtida pelo equipamento Nanovue[®]. *p< 0,05. **p<0,01. ***p<0,001. As letras (a, b, c) representam as diferenças estatísticas entre as medias.

<u>B) DNA</u>

O DNA extraído foi quantificado, em NanoDrop® e, baseando-se nos valores obtidos, as amostras foram diluídas a 20ng/µL, e submetidas a uma PCR em termociclador Applied Biosystems ViiA 7 system (laboratório de Hanseníase da FioCruz-RJ), com *primers* para o gene endógeno 18S rRNA. Notamos uma grande incoerência dos C_Ts resultantes (de 21,2 a 39,8) (Figura 21), então optamos por realizar uma nova quantificação no equipamento Qubit®, que avalia diretamente a quantidade de moléculas de DNA por marcação fluorescente específica, a fim de verificar se contaminantes químicos poderiam estar interferindo na quantificação pelo método de absorbância realizada pelo NanoDrop®, e esta nova quantificação revelou valores totalmente diferentes e sem nenhuma relação com os valores obtidos na primeira aferição (Tabela 4). Uma nova PCR foi realizada com diluição das amostras a 5ng/uL, baseando-se nos valores de quantificação do Qubit[®]. E mais uma vez os C_Ts resultantes foram incoerentes (de 17,4 a 35,5) (Figura 22).

Amplification Plot 1.500 0.1 ΔRn 01534 0.01 0.001 10 12 14 16 18 20 22 24 26 28 30 32 34 36 38 40 Cycle

Figura 21 - Curva de amplificação – Amostras quantificadas em NanoDrop[®]

Curva de amplificação de PCR em tempo real usando *primers* para gene endógeno (18S rRNA), realizada com amostras de DNA quantificadas em NanoDrop[®] e diluídas a 20ng/µL. C_Ts obtidos de 21,2 a 39,8 em Termociclador Applied Biosystems ViiA 7 system.

Figura 22 - Curva de amplificação – Amostras quantificadas em Qubit[®].



Gráfico de amplificação de PCR em tempo Real usando *primers* para gene endógeno (18S rRNA), realizada com amostras de DNA quantificadas em Qubit[®] e diluídas a 5ng/µL. C_Ts obtidos de 17,4 a 35,5 em Termociclador Applied Biosystems ViiA 7 system.

Diante destes resultados pensou-se que as amostras poderiam conter contaminantes químicos que estariam interferindo tanto na quantificação total do DNA, quanto na PCR. Assim, as amostras de DNA foram submetidas a uma nova etapa de precipitação na tentativa de purificalas dos possíveis contaminantes químicos, e então submetidas novamente a quantificação em NanoVue®, que apresentou valores diferentes dos encontrados nas quantificações anteriores. Baseando-se nesses últimos valores obtidos, e partindo da menor concentração encontrada, todas as amostras foram diluídas a 7ng/µL, e submetidas à PCR com o gene endógeno GAPDH em termociclador CFX96[™] Real-Time PCR Detection Systems, que então mostrou C_Ts coerentes (de 19,4 a 21,6) (Figura 23).

Os dados das diferentes quantificações e os C_Ts obtidos nas PCRs de algumas das amostras testadas antes e após a purificação podem ser comparados na Tabela 4.



Figura 23 - Curva de amplificação de gene endógeno com amostras purificação.

Curva de amplificação de PCR em tempo real usando *primers* para gene endógeno (GAPDH), realizada com amostras de DNA após etapa de purificação, quantificadas em NanoVue[®] e diluídas a 7ng/ μ L. C_Ts obtidos de 19,4 a 21,6. PCR realizada em termociclador BioRad (CFX96TM Real-Time PCR Detection Systems).

			•• ® •• • •	C _T antes da	CT após	
Amostra	ing/μL]	Qubit [®] [ng/μL]	Nanovue° [ng/μL]	Quantificação	Quantificação	purificação
				NanoDrop [®]	Qubit [®]	Nanovue
1	119,1	5,5	20,5	33	20	21
2	140,4	2,9	8,8	ND	ND	20
3	141,3	4,6	92 <i>,</i> 0	34	ND	21
4	220,1	10,5	261,5	37	19	20
5	234,1	14,5	151,0	ND	28	20
6	246,3	8,8	202,5	ND	20	21
7	268,8	9,0	162,0	26	21	21
8	280,1	16,9	210,0	33	22	20
9	321,3	22,6	297,5	ND	34	20
10	398,6	17,8	749,5	36	25	21
11	400,4	15,9	47,5	23	23	20
12	408,3	18,1	883,0	27	20	21
13	435,5	9,0	139,0	30	ND	20
14	447,1	17,2	282,5	21	20	22
15	1659,3	23,7	711,5	29	ND	21
16	1896,3	27,0	842,0	ND	ND	21

Tabela 4 – Quantificação de DNA e C_Ts com protocolos diferentes

Quantificação de DNA [ng/ μ L] em NanoDrop[®] e em Qubit[®], e C_Ts obtidos em PCR baseada nas quantificações, antes da purificação. E quantificação em NanoVue[®] e C_Ts das mesmas amostras após purificação. ND=Não Detectada.

A quantificação realizada após a purificação foi considerada a mais correta, e então foi usada para avaliar a quantidade total de DNA por fragmento ao longo da cultura. Os valores de ng total de DNA, apesar dos desvios entre as triplicatas de cada grupo (Pele e Dia), mostram uma tendência em diminuição de DNA ao longo da cultura (Gráfico 4). Gráfico 4 – Quantificação de DNA total das 3 peles



Média de DNA total (n= 3 explantes do grupo MLV) em nanogramas (ng) extraído de explantes das 3 peles, ao longo dos dias de cultura (D0, D4, D7, D14, D28 e D60), comparação entre as 3 peles usadas e a respectiva média por tempo. Quantificação obtida pelo equipamento Nanovue[®].

3.4.3.2.2. Viabilidade e expressão gênica da Pele e dos bacilos

<u>A) Pele</u>

O gene 18S rRNA foi usado como gene endógeno, alvo para avaliar a taxa de expressão gênica da pele ao longo do tempo de cultura. Os C_Ts obtidos na RT-PCR realizada com cDNA sintetizado a partir de 500 ng de RNA de cada explantes, quando analisados juntos, sem considerar peles e inoculações diferentes, mostram variação semelhante ao longo dos tempos, com diferença estatística encontrada entre D0 e D7, onde D0 apresentou C_Ts maiores (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Threshold Cycle (CT) de RT-PCR 18S rRNA de todos explantes



 C_T de cada explante obtido na RT-PCR para o alvo 18S rRNA, realizada com cDNA sintetizado a partir de 500ng de RNA. Todas amostras (3 Peles, MLV e Salina) foram plotadas no gráfico e mostram a expressão gênica do 18S rRNA na pele ao longo do tempo de cultura. *p<0.05.

Quando o gene endógeno foi analisado entre os grupos de inoculação (com ou sem bacilos), os explantes com salina entre as 3 peles apresentaram maior dispersão dos C_Ts, que variaram de 9,2 e 15,2, e o C_T médio das 3 peles foi de 10,6 e 13,6, com os maiores C_Ts em D14, D28 e D60 (Gráfico 6), porém não houve diferença estatística para nenhum dos tempos, assim como quando os valores foram separados por pele (Figura 24).



Gráfico 6 - Threshold Cycle (CT) de RT-PCR 18S rRNA - Grupo Salina

 C_T médio (n=3) da RT-PCR para o alvo 18S rRNA de cada pele do grupo inoculado com<u>salina</u>, em cada tempo de cultura. Dado de D60 da Pele2 e D4, D7 e D28 da Pele 3, ausente.

Figura 24 - Threshold Cycle (CT) de RT-PCR 18S rRNA grupo Salina por pele



C_Ts da RT-PCR para 18S rRNA de cada explante ao longo do tempo de cultura distribuído por pele. Explantes inoculados com <u>salina</u>. Dado de D60 da Pele2 e D4, D7 e D28 da Pele 3, ausente.

O grupo MLV apresentou maior homogeneidade entre os C_Ts (exceto pelos explantes de D0 e de D60), entre D4 e D28 os C_Ts variaram de 9,4 e 12,2, e o C_T médio das 3 peles foi de 10,1

e 16,3, os menores C_Ts médios foram obtidos em D4, D7 e D14 (10,1, 10,2 e 10,5, respectivamente), e quando comparadas todos os explantes das 3 peles juntas as diferenças estatísticas encontradas (*p<0,05) foram em D0 comparado com D4, D7 e D14, e D60 comparado com D4 e D7 (Gráfico 7). Quando analisados separados por pele, os C_Ts apresentaram diferença estatística na pele 2, D0 comparada com os demais tempos, e na pele 3, quando comparado D4 com D28 (Figura 25).



Gráfico 7 - Threshold Cycle (CT) de RT-PCR 18S rRNA – Grupo MLV

 C_T médio (n=3 explantes por pele) da RT-PCR para o alvo 18S rRNA de cada pele do grupo inoculado com <u>MLV</u>, em cada tempo de cultura. Diferença estatística entre as médias. Dado de D60 da Pele2 ausente. *p<0,05.

Figura 25 - Threshold Cycle (CT) de RT-PCR 18S rRNA Grupo MLV por pele



C_Ts da RT-PCR para 18S rRNA de cada explante distribuído por pele. Explantes inoculados com <u>MLV</u>. Dados da Pele2 D60 ausentes. *p<0,05.

O Gráfico 8 mostra os C_Ts médios dos grupos de inoculação (MLV e Salina) separados por pele e suas médias ao longo dos dias de cultura. Os bacilos inoculados não causaram diferença estatisticamente significante na expressão gênica do 18S rRNA ao longo da cultura.



Gráfico 8 - Threshold Cycle (C_T) de RT-PCR 18S rRNA – Grupo MLV e Salina em cada pele

C_T médio da RT-PCR para o alvo 18S rRNA de cada grupo de inoculação, MLV e Salina (SA), separado por pele, e média de cada grupo ao longo dos dias de cultura. Dado de D60 da Pele2 e D4, D7 e D28 SA da Pele 3, ausentes.

Para avaliar a quantidade e qualidade das moléculas de DNA do genoma humano ao longo da cultura, uma PCR para o alvo GAPDH foi realizada com as amostras de DNA extraído dos explantes MLV, após a purificação. O gene foi amplificado em todas as amostras, e os C_Ts obtidos ficaram entre 19,5 e 21,6, e a variação se manteve semelhante dentro de cada tempo, sem diferença estatística entre os tempos de cultura (Gráfico 9).





 C_T obtido pela PCR para o alvo GAPDH de cada explante inoculado com MLV, PCR realizada em amostras de DNA, após purificação, quantificação em NanoVue[®] e diluídas a 7ng/µL. Dado de D60 da Pele2 ausentes.

Quando os C_Ts foram analisados separados por pele, apenas os explantes da pele 3 apresentaram diferença estatística ao longo do tempo de cultura, quando comparado D0 com D4, D28 e D60, D4 com D7, e D7 com D28 (Figura 26). E entre as peles as médias não tiveram diferença significativa (Gráfico 10).

Figura 26 - Threshold Cycle (CT) da PCR para GAPDH separado por pele



C_Ts da PCR para alvo GAPDH de cada explante separado por pele. PCR realizada em amostras de DNA, após purificação, quantificação em NanoVue[®] e diluídas a 7ng/µL. Explantes inoculados com <u>MLV</u>. Dados da Pele2 D60 ausentes. *p<0,05, **p<0,01.

Gráfico 10 - Threshold Cycle da PCR para o alvo GAPDH, média de cada pele



C_Ts médio (n=3) da PCR para o alvo GAPDH de cada pele. PCR realizada em amostras de DNA, após purificação, quantificação em NanoVue[®] e diluídas a 7ng/µL. Explantes inoculados com MLV. Dados da Pele2 D60 ausentes

O gene GAPDH foi usado como referência para estimar a viabilidade dos explantes ao longo do tempo pela expressão gênica de 18S rRNA, usando a fórmula $2^{\Delta CT}$, onde o ΔCT foi calculado subtraindo os valor de C_T de 18S rRNA do valor de C_T de GAPDH, e o valor de ΔCT obtido aplicado na fórmula $2^{\Delta CT}$.

A diferença estatística significante foi encontrada ente D7 e D28, quando os valores foram analisados pelas médias das peles juntas, para as demais comparações não houve diferença estatisticamente significante, e no geral as menores viabilidades, são do início (D0) e fim de cultura (D60). Em D0 provavelmente pelo tempo que a pele ficou em processamento no fluxo laminar (Pele1 = 56h, Pele 2 = 30h, Pele 3 = 32h), até ser transferida para estufa em condições ideais de cultura (Meio de cultura, 37°C, 5% CO₂). Os valores de viabilidade relativa (18S rRNA/GAPDH) estão apresentados na Figura 27.





Viabilidade relativa da pele. Calculada usando a fórmula $2^{\Delta CT}$, onde o ΔCT foi calculado subtraindo os valor de C_T de 18S rRNA do valor de C_T de GAPDH, e o valor de ΔCT obtido aplicado na fórmula $2^{\Delta CT}$, e dividido por 10 para padronização dos número. Os dados são mostrados por pele, inoculadas com MLV. Dados de D60 da Pele 2 ausente. *p<0,05.

B) Bacilos

Em relação a viabilidade dos bacilos nos explantes, a RT-PCR para o alvo 16S rRNA do *M. leprae* foi testada, e a especificidade confirmada usando cDNA sintetizado a partir de RNA extraído dos explantes com inóculo de bacilos autoclavados, e essas amostras não apresentaram amplificação.

Para a condição de explante com inóculo de bacilos viáveis, de D0 à D60, nas 3 peles diferentes, apenas 1 dos 3 explante de D0 da pele 1 apresentou C_T acima de 40 (considerado não detectável), todos os outros (53) foram amplificados com C_Ts de 27,7 a 39,7 (Tabela 5), com TM de 83°C, confirmando a especificidade do *amplicon*. Cinco amostras das 53 tiveram C_T acima de 35, sendo elas 3 do grupo D0 e 2 do grupo D60.

	Pele1	Pele2	Pele3
	28,05	34,73	30,29
D0	37,32	38,30	33,51
	ND	35,34	34,95
	28,66	32,66	28,74
D4	28,45	31,70	29,84
	27,70	31,08	28,01
	29,21	30,75	33 <i>,</i> 35
D7	29,77	30,27	33,19
	29,70	33,21	29,43
	29,71	29,80	29,80
D14	29,01	29,19	28,92
	30,00	30,54	28,79
	31,03	30,65	28,37
D28	31,27	32,37	31,61
	31,43	33,82	33,70
	31,30	NR	29,81
D60	37,17	NR	30,22
	39,71	NR	32,90

 C_T s obtidos na RT-PCR realizada com cDNA sintetizado a partir de 500 ng de RNA extraído dos explantes inoculados com bacilos (MLV). NR = explante não processado, ND = Alvo não detectado. Em negrito o menor e maior C_T em cada pele.

Quando considerado o C_T médio dos explantes (3 peles juntas), sem normalização com gene referência, as diferenças estatísticas encontradas foram entre D0 comparada com D4 e D14, e D14 comparado com D60, sendo que D4 e D14 mostraram os menores C_T s indicando maior quantidade de RNA do alvo (Gráfico 11).



Gráfico 11 - Threshold Cycle de RT-PCR para o alvo 16S rRNA

 C_T médio da RT-PCR para 16S rRNA realizada com cDNA sintetizado a partir de 500 ng de RNA extraídos dos explantes inoculados com MLV. • C_T médio de 3 explantes por tempo e pele. $* C_T$ médio das 3 peles. Linha pontilhada linha de tendência da média. Dados de D60 da pele 2 ausentes. *p<0,05. **p<0,01.

Quando consideradas as amostras separadas por pele, a diferença estatística encontrada para a Pele 1 foi entre as amostras D4 e D60, para Pele 2 entre as amostras D4, D7, D14 quando comparadas com D0, e para a Pele 3 não houve diferença entre os tempos (Figura 28). No geral os maiores C_Ts, indicando menor número de molécula alvo, foram observados no tempo D0 e D60.





C_Ts da RT-PCR para 16S rRNA de cada explante distribuído por pele. Explantes inoculados com MLV. Dados de D60 da pele 2 ausentes. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

De acordo com a análise do C_T , desconsiderando a normalização com gene endógeno da pele, as amostras nos tempos D0 e D60 apresentaram maiores C_Ts (indicativo de menor quantidade de sequência alvo), e as amostras entre D4 e D28 apresentaram menores C_Ts .

Com intensão de quantificar e estimar a viabilidade bacilar, uma PCR com *primers* para o gene RLEP foi realizada e a taxa de viabilidade estimada pela fórmula $2^{\Delta CT}$.

A média dos C_Ts obtidos das 3 peles mostram diferença estatística quando comparado D0 com D14, D28 e D60, e D7 com D14 e D60, sendo que os C_Ts diminuem ao longo do tempo, indicando aumento da sequência alvo disponível (Gráfico 12).

Gráfico 12 - Threshold Cycle (CT) PCR para RELP



 C_T médio da PCR com *primers* para região RLEP, realizada com DNA após etapa de purificação, diluído a 7ng/µL. Explantes inoculados com MLV. • C_T médio de 3 explantes por tempo e pele. $* C_T$ médio das 3 peles. Linha pontilhada linha de tendência da média. Dados de D60 da pele 2 ausentes. *p<0,05.

Quando os C_Ts são analisados separados por pele, a única diferença estatisticamente significante foi encontrada na pele 3 entre D0 e D60 (Figura 29)

Figura 29 - Threshold Cycle (C_T) da PCR para o alvo RLEP separado por pele



C_Ts obtidos na PCR para RLEP de cada explante distribuído por pele. Explantes inoculados com MLV. Dados de D60 da pele 2 ausentes. * p<0,05.

Utilizando o gene RLEP como gene referência, a viabilidade relativa do *M. leprae* foi estimada em cada explante pelo gene 16S rRNA usando a fórmula $2^{\Delta CT}$, onde o ΔCT foi calculado subtraindo os valor de C_T de 16S rRNA do valor de C_T de RLEP, e o valor de ΔCT obtido aplicado na fórmula $2^{\Delta CT}$.

O Figura 30, mostra a viabilidade em cada tempo de cultura com diferença significativa apenas entre D7 e D60. Quando os explantes foram separados por pele a análise estatística não mostrou diferença significativa.

No geral a viabilidade relativa para o *M. leprae* parece se manter até o 28º dia, reduzindo no final do tempo de cultura (D60).



Figura 30 - Viabilidade relativa do M. leprae (16S rRNA/RLEP)

Viabilidade relativa do bacilo no explante inoculado com MLV, ao longo do tempo separados por pele. Valores de viabilidade obtidos pela fórmula $2^{\Delta CT}$, usando DNA-RLEP como gene referência. Dados de D60 da Pele 2 ausentes. *p<0.05.

A fim de identificar divisão celular dos bacilos nos explantes, foi desenhado um par de *primers* para a região gênica da proteína FtsZ, envolvida na fissão binária da micobactéria.

Os *primers* FtsZ, desenhados no programa *Primer3*, foram testados em amostras de DNA e cDNA de *M. leprae*, e DNA e cDNA de pele humana, em diferentes temperaturas de *annealing*

(TA). Em todas TA testadas nenhuma amostra humana foi amplificada, mostrando especificidade dos *primers*, a amostra de cDNA obtida de suspensão de *M. leprae* usada nos primeiros testes também não mostrou amplificação, a única amostra amplificada foi de DNA de *M. leprae*. Nos testes com DNA a melhor TA para a reação foi considerada a de 64ºC, como demostrada na Tabela 6.

Após os testes iniciais a RT-PCR com os *primers* FtsZ foi realizada para os explantes inoculados com MLV, e não houve nenhuma amplificação detectável em sinal de expressão deste gene.

ТА	_65,	2º_	_64,	<u>0º</u> _	_62,	6º_	_57,	8º_	_53,	<u>9º</u> _	_51,	3º_	_50,	0º_
Amostra	C_{T}	ΤM	C_{T}	ТМ	C_{T}	ΤM	C_{T}	ΤM	C_{T}	ТМ	C_{T}	ТМ	CT	ТМ
DNA-ML	34,2	89	29,5	89	30,0	89	32,7	89	34,4	89	35,2	89	34,6	89
DNA-P	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Tabela 6 - Teste de temperatura de annealing para primers FtsZ

cDNA-P ND PCR realized para teste dos primers FtsZ. TA = Temperatura de annealing, C_T = (Threshold Cycle), TM = Temperatura de Melting. Amostras: DNA-ML = DNA extraído de suspensão de M. leprae, DNA-P = DNA extraído de pele humana sem bacilo, cDNA-P = cDNA sintetizado a partir de amostra de RNA extraído de pele humana sem bacilo. Em negrito a melhor TA e melhor C_T encontrado.

C) Modulação da resposta imune

Na tentativa de se observar alguma influência na expressão gênica de moléculas do sistema imune nos explantes, foi realizada RT-PCR com *primers* para TGF- β . O C_T médio encontrado para cada tempo de cultura em cada grupo MLV e Salina são mostrados no Gráfico 13 e Figura 31, e os valores de expressão relativa calculados pela fórmula 2^{Δ cT} usando o 18S rRNA como gene referência, são mostrados para cada pele e grupo na Figura 32.

Tanto pela análise do C_T médio (Gráfico 13) como pela expressão relativa (Figura 31), observa-se que em D0 há uma baixa amplificação do alvo, tendo alguns explantes do grupo MLV (4 de 9) com amplificação não detectável (C_{Ts} acima de 40, considerado como amplificação não detectável, foram retirados da análise).

Pela análise dos C_{Ts} observa-se que em D4 ocorre a diminuição dos valores tanto para MLV quanto para Salina, indicando maior expressão deste gene, expressão que nos tempos seguintes diminui, porém sempre em uma taxa acima do D0.





 C_T médio da RT-PCR para TGF- β realizada com as amostras de cDNA sintetizadas a partir de 500 ng de RNA extraídos de cada explante. Ao longo do tempo de cultura nos dois grupos, MLV e Salina. *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001.

Figura 31 - *Threshold Cycle* de cada explante para TGF- β (MLV – Salina)



C_T de cada explante obtido na RT-PCR para o alvo TGF- β nos dois grupos de inoculação (MLV e Salina). **p<0,01 ***p<0,001.

A expressão relativa, apresentada na Figura 32, mostra que os explantes da pele 1 e 2 com o inóculo MLV possuem expressão relativa de TGF- β menor quando comparada com os explantes do inóculo Salina, sendo que os explantes com os bacilos possuem expressão relativa semelhante ao D0, os explantes com salina tiveram um aumento da expressão após D0, com diferenças significativas entre os tempos na pele 1 e 2 (Figura 32).



Figura 32 - Expressão relativa de TGF- β em cada Pele e grupo de inoculação

Expressão gênica relativa de TGF- β , calculada pelo método $2^{\Delta cT}$, a partir de C_T obtidos de RT-PCR, usando o gene 18S rRNA como gene referência. *p<0,05. **p<0,01.

Quando a expressão gênica é avaliada por inóculo, sem separar as peles, é possível identificar diferença estatisticamente significativa entre os D4 e D14 entre os dois grupos (Gráfico 14).

Gráfico 14 - Expressão gênica relativa de TGF- β entre explantes com *M. leprae* e salina



Expressão gênica relativa de TGF- β , calculada pelo método 2^{ΔcT}, a partir de C_T obtidos de RT-PCR, usando 18S rRNA como gene referência. Amostras das 3 peles foram plotadas no gráfico, separadas entre explantes com bacilos (MVL) e sem bacilos (Salina). *p<0,05 **p<0,01.

3.4.4 Pele Masculina: observações

Esses dados estão em tópico separado pois são resultados de apenas uma repetição, com pele de indivíduo masculino, e com algumas diferenças metodológicas em relação aos procedimentos empregados às peles femininas, o que não faz apropriado que os dados sejam unidos. Porém, são resultados relevantes que devem enriquecer a discussão do trabalho no geral.

A Pele 4 foi obtida de abdominoplastia de um indivíduo do sexo masculino, branco, de 25 anos. A preparação da pele e organização dos explantes para a cultura nas placas foi idêntica a citada para as peles femininas.

Quanto a inoculação, essa foi realizada com mesma seringa usada nas peles anteriores, porém, com a agulha longa (26S gauge Small Hub RN NDL Sold, Halmilton[®]) (Figura 33), e 25 μL

de suspensão foi inoculada contendo 1x10⁴bacilos (nas peles anteriores foram inoculas 1,5x10⁴ bacilos).

Figura 33 – Seringa e agulha de inoculação da pele 4.

Seringa de 25 µL com agulha longa (26S gauge Small Hub RN NDL Sold, Halmilton[®]) utilizada para inoculação das suspensões nos explantes da pele 4.

Histologicamente, os explantes da pele masculina tiveram as mesmas alterações observadas nas peles femininas ao longo do tempo de cultura.

E bacilos foram identificados em todos os fragmentos corados em Fite-Faraco, e as mesmas observações realizadas em relação aos bacilos nas peles anteriores cabem para a Pele 4 (Figura 34).





Coloração Fite-Faraco específica para bacilos, explantes da Pele 4 em cultura por 4 (A), 14 (B), 28 (C, D), 60 (E) dias após a inoculação. Bacilo integro (seta), bacilo fragmentado (cabeça de seta) e globias (estrela). Aumento em objetiva de 100x.

Para a análise de biologia molecular apenas o RNA foi extraído, e a extração foi realizada com protocolo usando 1 mL de trizol por fragmento, diferente do empregado para os fragmentos das peles anteriores que usou 2 mL, o que gerou menor eficiência na quantidade de RNA total obtida por amostra (Gráfico 15). As razões (260/280) foram satisfatórias, entre 1,8 e 2,1, mostrando pureza das amostras. Assim como os fragmentos das peles femininas, os fragmentos da pele masculina também tiveram uma redução na quantidade total de RNA ao longo do tempo de cultura (Gráfico 16).

Gráfico 15 - RNA total Pele Masculina e Pele Feminina



Média de RNA total em nanogramas (ng) extraído de fragmentos (MLV, MLI e Salina) ao longo dos dias de cultura, comparação entre as 4 peles usadas. Barra preta mostra a média das peles femininas (1, 2 e 3). Barra cinza representa a média da pele masculina. Quantificação obtida pelo Nanovue[®]



Gráfico 16 - RNA total por grupo de tratamento da pele 4

Média de RNA total em nanogramas (ng) extraído dos explantes, por grupo de tratamento (MLV, MLI e Salina) ao longo dos dias de cultura. Fragmentos da pele 4. Dados de D0 de MLI e Salina ausentes. Quantificação obtida pelo Nanovue[®].

A RT-PCR para 16S rRNA foi realizada com cDNA sintetizado como protocolo já descrito, porém, partindo de 410ng de RNA. A reação apresentou positividade em todos os tempos de cultura, sendo que os 2 fragmentos de D0 foram os que mostraram C_{Ts} mais altos, 1 dos 3 fragmentos D28, e 1 dos 2 fragmentos D60 não tiveram amplificação detectável. O Gráfico 17 mostra os C_{Ts} de cada fragmento avaliado em cada tempo, estatisticamente apenas D0 foi diferente.



Gráfico 17. CT médio da RT-PCR para 16S rRNA dos explantes Pele 4

C_Ts da RT-PCR para 16S rRNA de cada fragmento da pele 4. Fragmentos inoculados com bacilos viáveis. Dados ausentes: 1 explante D60 e 1 D0. Não detectável: 1 explante D28 e 1 D60. *** p<0,001.

3.5 Viabilidade e Infectividade dos bacilos após cultura no hOSEC

Após os tempos de 28 e 60 dias em cultura nos explantes, os bacilos foram recuperados para inoculação em camundongos nude. Os resultados deste tópico serão divididos em duas partes, a primeira com dados referentes as culturas nas peles femininas (Pele1, Pele2, Pele3), e uma segunda parte com dados do experimento com a pele masculina (Pele 4).

Pele Feminina (Pele1, Pele2, Pele3):

Cada explante da cultura foi macerado para obtenção da suspensão de bacilos, e a suspensão obtida foi dividida entre 3 animais, sendo que cada animal recebeu 30μL por pata traseira totalizando 6 patas por explante. Cada condição em cultura D28-Pele1; D28-Pele2; D28-Pele3; D60-Pele1; D60-Pele3 tinha, respectivamente, o seguinte número de explante para inoculação *in vivo*: 6, 3, 3, 4, 5, totalizando 36 animais para D28, e 27 para D60. Alguns animais morreram antes do tempo de análise sendo 9 do grupo D28 e 6 do grupo D60. O resumo da casuística dos animais inoculados pode ser observado na Tabela 7.

Grupo	Animais inoculados	Óbitos (%)				
D28 - Pele1	18	4 (22,2)				
D28 - Pele2	9	0 (0,0)				
D28 - Pele3	9	5 (55,5)				
D60 - Pele1	12	0 (0,0)				
D60 - Pele3	9	5 (55,6)				
Total	63	15 (23,8)				

Tabela 7 - Casuística dos animais inoculados com suspensão do hOSEC.

Camundongos nude inoculados com suspensão de bacilos obtida de maceração de explantes mantidos em cultura por 28 e 60 dias.

Após o tempo estipulado de 5 meses, os animais foram eutanasiados e as patas removidas para análise, sendo que cada animal teve uma das patas macerada para obtenção de suspensão bacilar para coloração de Ziehl-Neelsen, e a outra pata dividida em duas partes, uma para análise histopatológica (Fite-Faraco e HE) e a outra para análise molecular por RT-PCR (16S rRNA). Dessa forma para cada pata e análise foram obtidos os seguintes dados:

Na análise histopatológica das lâminas em HE, todas as patas apresentaram um infiltrado celular predominantemente histiocitário (macrófagos jovens em diferenciação) central, com afluxo de outras células (plasmócitos, neutrófilo), em geral localizados no local de inoculação (Figura 35).

Figura 35 – Histopatologia da região do inóculo na pata do camundongo



Corte da pata de um dos camundongos nude inoculado com suspensão recuperada de hOSEC, corada com HE. Imagem mostra a área de inoculação, em destaque o infiltrado celular, predominantemente histiocitário central, com afluxo de outras células, esboçando um ganuloma. Aumento em objetiva de 4x e 40x.

Dos 27 animais do inóculo do dia 28, 4 animais tiveram leitura positiva no Ziehl-Neelsen, o resultado da contagem de número de bacilos por campo analisados foi 286/60, 29/60, 2/60 e 1/100, sendo esses inóculos de 2 explantes da Pele 3. Na análise histopatológica (Fite-Faraco) não foram observados bacilo em nenhuma das patas. Devido a erro metodológico dentre os 27 animais D28, apenas 5 tiveram amostras processadas para RT-PCR, e destas nenhuma foi positiva.

Dos 22 animais do inóculo do dia 60, 2 animais tiveram positividade no Ziehl-Neelsen (1 bacilo por 100 campos analisados) um foi inoculado com suspensão de explante da Pele 1 e outro da Pele 3. E um animal apresentou positividade no histopatológico (Fite-Faraco), sendo o mesmo que teve positividade no Ziehl-Neelsen, da Pele 3. E nenhuma das amostras tiveram amplificação na RT-PCR.

No geral, dos 48 animais que foram analisados, 27 D28 e 21 D60, respectivamente 4 e 2 tiveram análises positivas, sendo que nenhuma positividade para RT-PCR (Tabela 8).

Inóculo (explante)	Animais analisados	Identificação de bacilos (+) ou não (-) por animal	Positividade no grupo
D28 Pele1	2		
D28 Pele1	2		
D28 Pele1	3		
D28 Pele1	1	-	NEGATIVO
D28 Pele1	3		
D28 Pele1	3		
D28 Pele2	3		
D28 Pele2	3		NEGATIVO
D28 Pele2	3		
D60 Pele1	3		
D60 Pele1	3		ΡΟςΙΤΙΛΟ
D60 Pele1	3		FOSITIVO
D60 Pele1	3	+	
D28 Pele3	3	+ + +	
D28 Pele3	1	-	POSITIVO
D28 Pele3	0		
D60 Pele3	1	-	
D60 Pele3	1	+	POSITIVO
D60 Pele3	2		

Tabela 8. Resultados da Inoculação da suspensão de hOSEC in vivo

Explantes após tempo de cultura (28 e 60 dias) foram macerados e a suspensão de bacilos obtida foi inoculada em 3 camundongos nude. Após 5 meses da inoculação o animal foi eutanasiados e as patas analisadas por 3 métodos diferentes (Ziehl-Neelsen, Fite-Faraco e RT-PCR). <u>Primeira coluna</u> mostra o tempo de cultura e de qual pele a suspensão foi obtida. <u>Segunda coluna</u> mostra quantos dos 3 animais inoculados sobreviveram até o momento da análise. <u>Terceira coluna</u> mostra a positividade do animal para pelo menos uma análise, cada símbolo representa um animal, sendo que '+' para positivo em pelo menos uma análise, e '-' para negativo quando todas as análises não identificaram bacilo. <u>Quarta coluna</u> mostra POSITIVO quando pelo menos um animal do grupo (tempo e pele) teve positividade em algum dos testes.
Figura 36 – Macerado de pata de camundongo nude com inóculo de hOSEC



Imagens de macerado de pata de camundongo nude corados com Ziehl-Neelsen. Pata analisada após 5 meses da inoculação com suspensão obtida de explante com MLV de 28 dias de cultura. Bacilos bem corados nas setas. Imagens obtidas em aumento de objetiva de 100x.

Pele Masculina (Pele 4):

Explantes D28 e D60 da Pele 4 foram macerados da mesma forma que os explantes das outras peles. A suspensão bacilar obtida de cada explante de D28 foi dividida para dois camundongos, sendo que cada pata traseira foi inoculada com 30 µL de suspensão. A suspensão de cada explante D60 foi dividida entre as patas traseiras de 5 camundongos.

Ao todo foram 5 explantes D28 inoculados em 10 camundongos, e 2 fragmentos D60 inoculados em 10 camundongos. Todos os animais do grupo D28 sobreviveram até o tempo de análise, e 3 do grupo D60 morreram antes da análise (Tabela 9).

Tabela 9 - Casuística dos animais inoculados com suspensão da Pele 4	

Grupo - (nº explantes)	Animais inoculados	Óbitos (%)
D28 – (5)	10	0 (0,0)
D60 – (2)	10	3 (30,0)
Total	20	3 (15,0)

Camundongos nude foram inoculados com suspensão de bacilos obtida de maceração de explantes da Pele 4, mantidos em cultura por 28 e 60 dias.

Após 5 meses da inoculação, os animais foram eutanasiados e as patas removidas para análise, sendo que cada animal teve uma das patas macerada para obtenção de suspensão bacilar para coloração de Ziehl-Neelsen, e a outra pata dividida em duas partes, uma para análise histopatológica (Fite-Faraco e HE) e a outra para análise molecular por RT-PCR (16S rRNA). Todos os explantes (D28 e D60) apresentaram positividade em pelo menos um dos animais analisados, em pelo menos uma das técnicas de análise (Tabela 10).

Inóculo (explante)	Animais analisados	Identificação de bacilos (+) ou não (-) por animal	Positividade no grupo
D28 Pele4	2	+ +	
D28 Pele4	2	+ +	
D28 Pele4	2	+ -	POSITIVO
D28 Pele4	2	+ -	
D28 Pele4	2	+ +	
D60 Pele4	4	+ + + -	
D60 Pele4	3	++-	FUSITIVU

Tabela 10 – Resultado Inoculação da suspensão de hOSEC (Pele 4) in vivo.

Explantes após tempo de cultura (28 e 60 dias) foram macerados e a suspensão de bacilos obtida de cada explante D28 e D60 foi inoculada, respectivamente, em 2 ou 5 camundongos nude. Após 5 meses da inoculação o animal foi eutanasiados e as patas analisadas por 3 métodos diferentes (Ziehl-Neelsen, Fite-Faraco e RT-PCR). <u>Primeira coluna</u> mostra o tempo de cultura da suspensão obtida. <u>Segunda coluna</u> mostra quantos dos animais inoculados sobreviveram até o momento da análise (apenas o grupo D60 teve óbitos). <u>Terceira coluna</u> mostra a positividade do animal para pelo menos uma análise, cada símbolo representa um animal, sendo que '+' para positivo em pelo menos uma análise, e '-' para negativo quando todas as análises não foram capazes de detectar o bacilo. <u>Quarta coluna</u> mostra 'POSITIVO' quando pelo menos um animal do grupo (tempo e pele) teve positividade em alguma das análises.

A identificação de positividade nos animais foi a seguinte: Em pelo menos uma das técnicas de microscopia, 64,7% dos animais foram positivos, sendo que pela análise de macerados (Ziehl-Neelsen) foi possível detectar bacilos em 9 patas, sendo 60% dos inoculados com D28 e 42,9% dos inoculados com D60. Pela análise histopatológica (Fite-Faraco) foram positivos 50% dos inoculados, sendo que apenas os de D28 foram positivos e nenhum dos inoculados com D60. Pela RT-PCR, em 52,9% dos animais houve amplificação da região alvo 16S rRNA, o que reforça a confirmação de viabilidade bacilar após o cultivo nos explantes em até 60 dias e após 5 meses de cultura *in vivo* na pata.

Das 11 patas positivas nas análises de microscopia, 7 também tiveram positividade na análise molecular (63,6%), sendo que entre as positivas na coloração de Ziehl-Neelsen, 5 (80,0%) foram RT-PCR positivas, e entre as positivas no histopatológico Fite-Faraco, 4 (80%) foram positivas na RT-PCR. Além disso, a RT-PCR mostrou positividade em 2 amostras negativas na análise microscópica. No geral, a RT-PCR mostra viabilidade em 9 animais (52,9%), sendo 6 (60,0%) dos inóculos de D28 e 3 (42,9%) dos inóculos D60 (Tabela 11).

A Figura 37, mostra bacilos detectados pela coloração de Fite-Faraco na pata de um dos animais.

Inóculo	ZN (+)	FF (+)	RT-PCR	Pelo menos uma	ZN e	FF e	Pelo menos uma
(nº de animais)	(%)	(%)	(+) (%)	técnica microscopia (+)(%)	RT-PCR (+) (%)	RT-PCR (+) (%)	técnica microscopia (+) e RT-PCR (+) (%)
D28 (10)	6 (60,0)	5 (50,0)	6 (60,0)	8 (80)	4 (40,0)	4 (40,0)	6 (60,0)
D60 (7)	3 (42,9)	0 (0,0)	3 (42,9)	3 (42,9)	1 (14,3)	0 (0,0)	1 (14,3)
Total (17)	9 (52,9)	5 (50,0)	9 (52,9)	11 (64,7)	5 (29,4)	4 (40,0)	7 (41,2)

Tabela 11 - Positividade das patas inoculadas com suspensão de hOSEC da Pele 4.

Positividade para *M. leprae* nas patas dos camundongos nude, microscopia e biologia molecular. ZN=Ziehl-Neelsen, do macerado de uma pata; FF= Fite-Faraco, realizado com metade da segunda pata. Figura 37 - Fotomicrografia da pata do camundongo nude com bacilos.



Corte histológico da pata de camundongo nude, em coloração Fite-Faraco, coloração específica para bacilos. Pata após 5 meses de inoculação com suspensão de 28 dias de cultivo na Pele 4. Demonstrando bacilos de aspecto integro. Objetiva de 100x.

3.6 hOSEC e inóculos clínicos

Ao longo do trabalho, paralelamente, amostra de 5 pacientes (P1, P2, P3, P4 e P5) foram obtidas (1 raspado dérmico, e 4 biópsias de pele), e suspensão de bacilos destas amostras foram inoculadas em fragmentos de pele e cultivados como descrito anteriormente para as outras suspensões teste.

3.6.1 - Caracterização clínica dos pacientes (Ambulatório da Dermatologia de Hanseníase (ADMH) – HCFMRPUSP)

Os 5 pacientes são portadores de hanseníase em atividade após tratamento, atendidos no ADMH durante os anos de 2017 e 2018, com suspeita de recidiva e/ou resistência e/ou tratamento insuficiente, cujas características demográficas e nosológica encontram-se descritas na Tabela 12.

Os pacientes apresentaram média de idade de 43 anos (Max=66, Min=25), 2 do gênero feminino e 3 masculinos, com origem ou procedência no estado de São Paulo há mais de dez anos. Todos multibacilares sendo, quatro classificados como hanseníase dimorfo-virchowiana e um com forma virchowiana, quatro caracterizados como falência terapêutica e um como recidiva após período médio de 18 meses de tratamento. Aspectos clínicos de dois pacientes estão ilustrados na Figura 38.

P	ac	Idade	Sexo	Diagnóstico Primário Classificação	Início do 1º tratamento	Término do tratamento	Esquema Tratamento	Nº Doses	Reação Hansênica
	1	25	F	MHDV	mar-17	fev-17	PQT-MB	12	ENH
	2	51	М	MHDV	abril, 2015	maio, 2016	PQT-MB Ofloxacina	16	NÃO
:	3	66	М	MHDV	jan, 1994	dez, 1995	PQT-MB	24	NÃO
	4	33	М	MHV	fev,2017	jan, 2019	PQT-MB	24	NÃO
!	5	40	F	MHDV	fev,2017	jan, 2018	PQT-MB	12	ENH

Tabela 12 - Caracterização demográfica e nosológica dos pacientes

Informações dos 5 pacientes que tiveram amostra coletada para extração de bacilos e inoculação no hOSEC. MHV = Hanseníase Virchowiana, MHDV= Hanseníase Dimorfo Virchowiana, PQT-MB= Poliquimioterapia para Multibacilares, ENH = Eritema nodoso hansênico.

Figura 38 – Imagens de aspectos clínicos dos pacientes



Paciente 3: com diagnóstico de hanseníase virchowiana com história de tratamento prévio com 21 doses de PQT-MB convencional (Falência Terapêutica), apresentando infiltração facial importante associada á madarose bilateral e assimétrica (A), infiltração de lobo auricular esquerdo (B) e placas eritemato-infiltradas nos joelhos, associadas a hansenomas na perna direita.



Paciente 4: com diagnóstico de hanseníase virchowiana, após 23 doses de PQT-MB mantendo sinais de atividade de doença (Falência Terapêutica) com (D) face infiltrada, rarefação lateral das sobrancelhas e hansenomas nos lábios, fronte, pavilhões auriculares, evidentes posteriormente (E); cotovelo esquerdo (F); em membros inferiores associados à amputação de hálux direito (G) e a ictiose distal intensa por disautonomia ilustrada no pé direito (H).

As amostras dos pacientes para extração dos bacilos e inoculação em hOSEC, foram coletadas após o tratamento convencional (PQT-MB) descrito na Tabela 12. Os dados laboratoriais, pré e pós o tratamento, até o momento da coleta das amostras, encontram-se descritas na Tabela 13.

	<u>Baciloscopia</u>		<u>Sorologia</u>		<u>Histopatologia</u>		PCR de lesão		<u>Mutação</u>
Рас	Pré-tto	Pós-tto	Pré-tto	Pós-tto	Pré-tto	Pós- tto	Pré-tto	Pós-tto	<u>no DNA</u> bacilar
1	г.	2.	ND	DOC	ND		DOC	DOC	NEC
T	5+	3+	INK	PUS	INK	BAAR+	PUS	PO5	NEG
2	3+	3+	POS	POS	BAAR+	BAAR+	POS	NR	NEG
3	DNE	4+	DNE	POS	BAAR+	BAAR+	NR	NR	NEG
4	DNE	4+	DNE	DNE	BAAR+	BAAR+	NR	POS	NEG
5	1+	4+	POS	POS	BAAR+	BAAR+	NR	POS	NEG

Tabela 13 - Dados laboratoriais dos pacientes.

Dados laboratoriais dos 5 pacientes que tiveram amostra coletada para extração de bacilos para inoculação no hOSEC, Pré e Pós- tratamento (Pré-tto, Pós-tto). Sorologia anti-PGL-I. DNE= Dados não encontrados, NR = Não Realizado, POS=Positivo, BAAR+=Bacilo Álcool Ácido Resistente encontrado na biópsia, NEG= Sem mutação nos genes rpoB, folP e gyrA.

Após a etapa de extração dos bacilos da amostra coletada dos pacientes, uma lâmina para coloração ZN foi preparada para certificar de que os inóculos continham bacilos, e para todas as suspensões obtidas os bacilos foram detectados.

As análises dos explantes inoculados foram realizadas entre 15 e 30 dias variando entre os inóculos (Tabela 14).

Paciente	Amostra coletado	ZN do material coletado	Tempo de análise do explante	Análise realizada
P1	Raspado dérmico	Positiva	D28	RT-PCR, FF, inoculação <i>in vivo</i>
c م	Hanconoma	Positiva	D33	RT-PCR, FF
PZ Hanse	Hallsellollia	POSILIVA	D44	RT-PCR, FF
cu	P3 Hansenoma	Decitiva	D15	RT-PCR, FF
P3		POSILIVA	D30	RT-PCR
			D15	RT-PCR, FF
P4	Hansenoma	Positiva	D26	RT-PCR, FF
			D29	Inoculação <i>in vivo</i>
			D15	RT-PCR, FF
P5	Hansenoma	nsenoma Positiva	D26	RT-PCR, FF
			D29	Inoculação <i>in vivo</i>

Tabela 14 - Casuística das amostras dos pacientes para inoculação em hOSEC.

Amostra de pacientes com hanseníase inoculadas em hOSEC. RT-PCR = RT-PCR com *primers* 16S rRNA, FF = Histopatologia coloração Fite-Faraco.

Em todos os tempos de análise mostrado na Tabela 14, a análise por FF dos explantes inoculados, demonstrou bacilos corados. A RT-PCR (16S rRNA) foi processada nos explantes de três pacientes (P1, P2 e P3), sendo que em dois deles (P1 e P2) houve amplificação de 16S rRNA.

Amostras dos explantes inoculados com as suspensões de 3 pacientes (P1, P4 e P5) também foram recuperadas para inoculação *in vivo*. A suspensão obtida do explante D30 do paciente P1, foi inoculada em 2 camundongos, e após 5 meses da inoculação, não apresentou positividade nas análises por microscopia, porém, a RT-PCR para os dois animais foi positiva, com C_Ts de 36 e 37. Os animais com os inóculos dos outros dois pacientes ainda estão no biotério, aguardando o tempo para análise.

No geral, dos cinco pacientes, três tiveram as amostras de hOSEC avaliadas. Sendo que o hOSEC inoculado com suspensão obtida do raspado dérmico do <u>paciente 1</u>, apresentou positividade na RT-PCR do explante mantido em cultura por 28 dias, além de apresentar positividade no camundongo inoculado com a suspensão obtida do hOSEC.

O hOSEC com amostra do <u>paciente 2</u> foi mantido em cultura por 33 e 44 dias e apresentou positividade na RT-PCR realizada no hOSEC de 33 dias, este paciente não teve material de hOSEC inoculado no camundongo.

As amostras do hOSEC do <u>paciente 3</u>, não apresentaram positividade da RT-PCR em nenhum dos tempos de cultura (15 e 30).

Discussão

Um dos mais misteriosos e sagazes microrganismos causadores de enfermidade humana, que desde muito tempo antes de Cristo circula pela humanidade, causando debilidades e incapacidade nos doentes e muitos estigmas sociais, o bacilo de Hansen, desde sua descoberta continua a driblar e desafiar os pesquisadores que buscam respostas para sua capacidade de subverter os mecanismos de defesa do sistema imune e de manter seu ciclo de vida aparentemente a níveis tão basais e silencioso (SCOLLARD, 2006).

Embora as características de crescimento rápido e capacidade de viver em diferentes meios e diversas condições possa parecer uma grande habilidade para um microrganismo, para o *M. leprae* a ausência destas características é que desafia o avanço dos estudos a seu respeito. Desde sua descoberta em meados do século XIX, muitas tentativas de se isolar e crescer esta micobactéria em diferentes formulações de meio, foram infrutíferas e principalmente irreprodutíveis (LIMA, 1937; LIMA, 1939; ISHAQUE, 1993; LEVY; JI, 2006; WADE, 1961).

Diante das limitações que a ausência do crescimento em laboratório do *M. leprae* traz à ciência e à terapêutica dos doentes, novos métodos que possam ser favoráveis ao crescimento e manutenção dessa micobacteria, ainda são e devem ser estudados.

O hOSEC, cultura de explante de pele, foco em nosso trabalho, faz parte de uma nova corrente de metodologias que buscam minimizar o uso de animais em pesquisa, que cada vez mais se fortalece, seja por consciência dos próprios pesquisadores ou por pressão da sociedade e de órgãos que defendem os direitos dos animais. Vários trabalhos trazem ensaios que avaliaram a pele humana em cultura, em diferentes plataformas, e mostram que até 15 dias a pele mantida em condições favoráveis com meio nutritivo, temperatura e oxigenação semelhantes ao organismo humano, conserva os aspectos fisiológicos semelhantes aos naturais, e assim são capazes de satisfazer as necessidades de um modelo experimental para observações e intervenções (JACOBS; LEHÉ; HASEGAWA, 2006, ANDRADE, et al 2015, XU et al., 2012, DANSO et al., 2014). Concordando com isso a pele do hOSEC, em nosso trabalho, até o 14º dia em cultura à análise histológica mostrou morfologia muito próxima à pele normal no tempo inicial quanto à

integridade da junção dermo-epidérmica, ao número de camadas epiteliais, à diferenciação dos queratinócitos e camadas granulosa e córnea. Além disso, a viabilidade relativa obtida pela razão cDNA/DNA no 14º dia se manteve semelhante aos explantes de pele nos tempos anteriores (D0, D4 e D7).

Mesmo diante da redução de atividade metabólica da pele nos tempos posteriores ao 14º dia, para se observar a possível multiplicação do *M. leprae*, diante de sua lenta replicação, estabelecemos que os explantes seriam mantidos em cultura por 60 dias, visto que em trabalho anterior (FRADE et al., 2015) a pele no hOSEC se manteve viável por período semelhante sob avaliação imunohistoquímica da expressão proteica de Ki-67 e KC5/6. Em nosso trabalho, a análise histomorfológica dos explantes mostrou que houve manutenção basal da estrutura da pele no 28º dia até o 60º, apesar de modificações em relação à espessura da epiderme (diminuição do número de camadas de queratinócitos da Camada Malpighiana) e à morfologia das fibras colágenas (diminuição da espessura e aumento dos espaços intersticial).

Na avaliação da pele em cultura, além da observação histológica, a viabilidade relativa usando os dados de PCR para expressão do gene 18S rRNA ribossomal e das cópias genômicas do GAPDH, mostrou uma viabilidade reduzida em D0 em comparação com os níveis entre o 4º e 14º dia de cultura, e uma nova redução no 28º dia seguido por um aumento no 60º dia.

Sabemos que no processo natural da pele, ocorre a diferenciação dos queratinócitos, que leva cerca de 28 dias, e se inicia com o seu deslocamento da camada basal, ou germinativa, em direção a camada córnea. Quando ele deixa a camada basal ele não se divide mais e passa por um processo de maturação, tendo seu interior preenchido com queratinas e seu núcleo degradado hidrolíticamente (GREEN, 1977), passa a ter um envelope quimicamente resistente feito de proteína e ligações cruzadas ε -(γ -glutamil) lisina, formando então o estrato córneo (MATOLTSY; BALSAMO, 1955; SUN; GREEN, 1976; RICE; GREEN, 1979). Esse processo pode ser notado, histologicamente, nas amostras do hOSEC do nosso trabalho, pela diminuição da espessura da epiderme, por ter seus queratinócitos se diferenciando e espessando a camada córnea. Nesse processo de maturação o nível de DNA e RNA nos queratinócitos cai junto com a perda de núcleo ativo, sendo a degradação do RNA, descrita ocorrer em torno de 24h, mais veloz do que do DNA que a depender das condições pode varia de 7 e 30 dias, ou até meses

(MORRISSEY, 1978; BORGES; HEPP; NONOHAY, 2015), nos explantes de nosso estudo a redução dos ácidos nucléicos ao longo do tempo é notória (Gráficos 3 e 4), e podemos associa-la com o processo de diferenciação dos queratinócitos e espessamento da camada córnea observada na histologia.

A menor taxa de viabilidade relativa no tempo zero comparada com os outros dias pode ser devido a uma diminuição do metabolismo geral das células da pele mediante a redução de suprimento nutritivo ou por todo o ambiente adverso ao qual a pele foi submetida durante o período que antecede a estabilização na estufa, de 30 a 50 horas equivalente ao tempo entre a excisão cirúrgica, descontaminação e processamento (fragmentação e inoculação) até ser transferida para estufa em condições ideais de cultura (Meio de cultura, 37ºC, 5% CO₂), sendo que em condições ideais o metabolismo volta ao estado normal que se mantém até o 14º dia. Para melhor avaliar esta condição, o ideal seria ter o padrão de viabilidade da pele no momento da excisão cirúrgica.

A redução da taxa de viabilidade vista no 28º dia é coerente com a redução no número de queratinócitos. XU et al. (2012), mostraram uma queda na taxa de proliferação dos queratinócitos da camada basal de explantes de pele em cultura, sendo de 26% no 4º dia, 7% no 12º dia e cessando no 14º dia. Nas nossas amostras, morfologicamente a camada basal/germinativa, junção dermo-epidérmica se mantendo estável até o 60º dia, porém provavelmente a proliferação dos queratinócitos da camada basal dos queratinócitos da camada basal também está diminuída, não sendo capaz de repor os queratinócitos na mesma velocidade que ocorre a diferenciação, levando à visível diminuição da espessura da epiderme, e a diminuição da viabilidade relativa após o 14º dia.

Visto que o habitat natural e mais comum do *M. leprae* é a pele humana, e sabendo que o *M. leprae* se apropria do metabolismo de macrófagos, sobrevivendo e se multiplicando no interior destas células, infecta as células de Schwann, célula glial que envolve os axônios dos neurônios periféricos e, além dessas células principais, o bacilo também pode infectar outras células em modelos experimentais, como em fibroblastos e células musculares (MASAKI, et al., 2013), em células epiteliais (SILVA, et al., 2013), e clinicamente visto em pacientes virchowianos com carga bacilar intensa que tem acometimento de órgãos como fígado, medula óssea e mucosa

respiratória alta (GARBINO, 2000), pareceu-nos promissor desafia-lo a sobreviver, e quem sabe se multiplicar, no modelo *ex vivo* de cultura de pele humana, uma vez que este modelo mantem as características histológicas da pele do hospedeiro, mantendo células epiteliais, células de Langerhans, glândulas, estruturas neurais, e com resposta imune limitada quando comparada ao organismo por completo.

Em nosso trabalho a suspensão de bacilos foi inoculada na região dérmica e sob à análise da coloração de Fite-Faraco os bacilos foram encontrados por toda a extensão da derme, além de menor número serem observados também na camada de queratinócitos e na camada córnea. A contagem dos bacilos pelo método de análise de corte histológico foi realizada apenas de forma demonstrativa, pois notamos que os valores encontrados não parecem ser representativos, uma vez que entre os explantes da triplicata houve grande inconsistência (Gráfico x).

Atualmente o índice morfológico, que consiste em realizar a contagem diferencial entre bacilos íntegros (considerados viáveis) e fragmentados (considerados inviáveis) em amostras coradas por Ziehl-Neelsen tem sido realizado por alguns centros de referência no diagnóstico e tratamento da hanseníase, sendo essa descrição morfológica considerada com maior importância nos casos de suspeita de recidiva, resistência medicamentosa, e no acompanhamento da evolução do tratamento (LASTÓRIA; ABREU, 2014; Guia de procedimentos técnicos, baciloscopia em hanseníase, 2010; WHO, 2017). Em nossas amostras essa análise de contagem e diferenciação morfológica foi desconsiderada pela subjetividade da análise, e também, por bacilos caracterizados como íntegros terem sido observados em grande número na suspensão de bacilos autoclavados.

Tendo em vista a subjetividade da análise das formas fragmentadas, em nosso trabalho consideramos que as morfologias, que não se enquadraram na descrição do característico bastonete corado uniformemente (Figura 16), não podem ser associadas à viabilidade ou à inviabilidade, visto que, os diferentes padrões morfológicos encontrados podem ser comparados com as morfologias descritas em outros trabalhos que também questionam a viabilidade das diferentes formas encontradas. Desde os contemporâneos de Hansen, há menção de um possível ciclo de vida do *M. leprae*, baseado nas diferentes morfologias em relação ao grau de granulação e fragmentação. Adolpho Lutz em 1886, usando microscopia de campo claro e diferentes técnicas

químicas, já descrevia várias formas bacilares observadas nas amostras de lesões dos pacientes virchowianos sem tratamento (Figura17). Mais tarde Souza-Araujo (1953) publica suas observações realizadas em amostras frescas de bacilos analisadas sob microscopia de contraste de fases e descreve muitas formas vivas e com morfologias variadas, que associa às ilustrações de Paldrock feitas ente 1914 e 1923 (Figura 18), muito semelhantes as já descritas por Adolpho Lutz, e também, às morfologias observadas por nós neste trabalho.

Entre outros padrões morfológicos as formas estreptococos e cocos que encontramos, comparadas com a forma bacilar uniformemente corada, poderiam ser bacilos em degeneração, porém diante das observações semelhantes realizadas por Souza-Araujo que utilizou amostras frescas obtidas de lesões ativas, e observou os bacilos vivos sem fixação ou uso de corantes, poderiam ser também fases de um ciclo de vida do bacilo, ou ainda, formas de resistência. Diante dessa literatura e de nossas observações no presente trabalho, cabe destacar a necessidade de maiores discussões em relação às considerações realizadas pelos centros de referência na análise de amostras de pacientes quanto a possíveis equívocos às análises de índice morfológico, viabilidade e, consequentemente, de atividade da doença.

Carvalho Lima e Maria Arantes (1939), nas tentativas de subcultivar os bacilos em seu meio modificado, relataram que formas diferentes menos coradas e sem granulações quando transferidas para meio novo tornavam a se corar intensamente e voltavam a apresentar grânulos. Outros trabalhos relatam mais observações em relação ao pleomorfismo no *M. leprae* (BAKER, 1981; MAURICE COURET, 1910; WADE, 1961; LIMA, 1939), e trabalhos do final da década de 80, usando microscopia eletrônica mostram as alterações celulares do *M. leprae* e de outras micobacterias, em amostras de pacientes e de camundongos tratados ou não, e relatam que a conformação da membrana do *M. leprae* é sensível aos protocolos de fixação, e que a característica de assimetria ou não da membrana frente a viabilidade deve ser observada com cautela (PORTAELS, et al., 1988) (SILVA; MACEDO, 1983).

Esforços em padronizar outros ensaios para determinar a viabilidade do bacilo que vão além da subjetividade em determinar o índice morfológico, incluem usar marcadores baseados na integridade da membrana, usando corantes fluorescentes que entram seletivamente na membrana com dano (*BacLight*) (LAHIRI; RANDHAWA; KRAHENBUHL, 2005; TROMBONE, et al.,

2014); no metabolismo bioquímico celular avaliando radiorespiração e oxidação de ácido palmítico (usando radioisótopos) (TRUMAN; KRAHENBUHL, 2001); e síntese proteica pelas técnicas de biologia molecular usando alvos de RNA ribossomal ou RNA mensageiro (LAVANIA, et al., 2008; MARTINEZ, et al., 2009; TURANKAR, et al., 2019), que tem a vantagem entre os primeiros de ter maior sensibilidade e não necessitar a purificação prévia dos bacilos. Devido à sua meia vida relativamente curta, o RNA tem sido usado com sucesso como um indicador de viabilidade para vários patógenos (BAQUE, et al., 2011; MONTENEGRO, et al., 2014).

Nosso trabalho, não distingue quais formas bacilares são viáveis ou não, e sabemos que há bacilos inviáveis desde o inóculo inicial, uma vez que a viabilidade com corantes fluorescentes, realizada na suspensão obtida do camundongo nude antes da inoculação nos explantes, apresentou apenas 13 e 14% de bacilos com comprometimento de membrana. E com base na avaliação do RNA ribossomal podemos com certeza afirmar que bacilos metabolicamente ativos chegaram até o fim do período de cultura (60 dias), uma vez que todos os explantes apresentaram amplificação na RT-PCR do alvo 16S rRNA, com C_Ts de 27,7 a 39,7, e interessantemente tendo os maiores C_{Ts} no tempo inicial (Tabela x), sendo que para um dos explantes de D0 o C_T ficou acima de 40.

A redução na quantidade de moléculas de RNA ribossomal nos explantes em D0, provavelmente não tem influência do hOSEC, uma vez que logo após o explante receber o inóculo ele foi transferido para solução de preservação e congelado para posterior extração do RNA. Então, o que poderia estar acontecendo é uma redução do metabolismo celular dos bacilos, mediante ao processo de extração do coxim plantar do camundongo e conservação da suspensão em temperatura baixa (em torno de 4ºC) até o momento da inoculação, processo que durou cerca de 20h. Truman e Krahenbuhl (2001) mostraram que os bacilos extraídos de coxim plantar de camundongos nude quando armazenados em suspensão em temperatura de 4ºC apresentavam uma diminuição na atividade metabólica, que foi avaliada pela taxa de oxidação do ácido palmítico. Ainda neste mesmo trabalho, eles mostram que essa suspensão após uma semana à 4ºC, quando inoculadas em camundongo BALB/c, ainda teve capacidade de infectar o animal. Em nosso trabalho, após o tempo D0, os explantes tiveram RNA ribossomal detectado

com C_{Ts} menores do que em D0, mostrando que possivelmente os bacilos após encontrarem condições mais favoráveis retomam o metabolismo normal.

A correlação da viabilidade celular com a presença de RNA ribossomal é mostrada por alguns autores também para outros microrganismos. Silva e Macedo (1987), mostram por microscopia eletrônica as etapas de degradação da *Mycobacteria aurus* no interior de macrófagos, evidenciando que a desorganização e degradação dos ribossomos são uma das primeiras etapas na degradação celular, ou seja, a desorganização ribossomal certamente expõe as moléculas de RNA de sua estrutura que são logo degradadas. Além da sensibilidade apresentada pela molécula de RNA ribossomal em relação à viabilidade, no caso do 16S rRNA do *M. leprae* usado neste trabalho, estima-se que tenha para cada uma cópia genômica cerca de 4000 moléculas de RNA (ESTRADA-G, et al., 1988), e grande especificidade, também relatada por Estrada-G, 1988, quando comparada com outras micobacterias. Outros trabalhos mostram a sensibilidade do alvo 16S rRNA para amostras tanto de pacientes como de murinos, e a correlação com os efeitos da quimioterapia, mostrando a eficiência e correlação da quantificação das moléculas de 16S rRNA e viabilidade celular, em relação a outros alvos, como *sod*A (Superoxido dismutase A), e técnicas como a análise de baciloscopia (KURABACHEW; WONDIMU; RYON; 1998; MARTINEZ et al, 2009).

O alvo RLEP usado para detectar cópias de DNA na amostra é uma região repetitiva não codificadora que por conter várias copias (29) por genoma tem uma boa sensibilidade na PCR e descrita correlação com a baciloscopia (MARTINEZ, et al., 2011; TRUMAN, et al., 2008; AZEVEDO, et al., 2016). Os C_{Ts} obtidos nos explantes pela PCR para o RLEP apresentaram uma tendência em diminuir ao longo do tempo (Gráfico 12), apresentando a menor média nos explantes do 60º dia, o que pode ser um indicativo de maior número de bacilos no final do período de cultura.

A viabilidade relativa calculada pela razão cDNA/DNA mostra semelhança entre o tempo inicial e o 4º dia, no 7º dia um aumento da taxa de viabilidade, e após o 14º dia uma redução, essa observação vale para as Peles 1 e 3 quando observadas separadamente, e a Pele 2 apresentou uma taxa de viabilidade constante ao longo do período observado. A viabilidade relativa que expressa a relação entre moléculas de DNA e RNA pode mostrar uma variação entre número de células viáveis, assim como, um aumento ou diminuição de metabolismo celular para uma dada célula ou conjunto de células. Dessa forma, para inferir taxa de crescimento ou morte é necessário que as observações sejam feitas em conjunto com outros dados.

Quando a amplificação obtida na PCR RLEP de cada explante foi correlacionada com número de bacilos, usando curva de diluição de DNA extraído de suspensão bacilar, os dados não apresentaram um padrão coerente entre as triplicatas de amostras (Figurax). Não descartamos a possibilidade de ter ocorrido perda aleatória de DNA no processo de extração e purificação, visto a grande variação na quantidade total de DNA obtida por explante (Figurax), o que poderia alterar/confundir a posterior análise de taxa de viabilidade ou número de bacilos ao longo da cultura.

Embora em modelo animal de multiplicação do M. leprae, e mais recentemente em linhagem celular (FERREIRA, et al., 2018), já ter sido evidenciado crescimento exponencial do M. leprae, Amako et al, em seu trabalho de 2016, utilizando PCR digital e marcação fluorescente mostraram que foi possível manter os bacilos vivos por até 120 dias em seu meio NK250 modificado, porém a multiplicação bacilar, avaliada pelo aumento de cópias de DNA, não apresentou padrão exponencial como encontrado para a maioria das outras bactérias e que o crescimento foi lento levando 60 dias ou mais para se ter um aumento significativo na contagem das células. Pela marcação fluorescente eles observaram que alguns bacilos nos agregados apresentavam comprometimento de membrana e estavam mortos, diante desses resultados deduziram que algumas células bacilares não participam da replicação, e outras se degeneram, o que levaria ao padrão de crescimento lento e não exponencial. Esse evento poderia também estar ocorrendo no hOSEC. Mesmo nos modelos in vivo (Tatu e camundongos), a avaliação do crescimento exponencial parece ser influenciada pela quantidade de inóculo, do animal experimental e da temperatura de manutenção dos animais, dependendo dessas variáveis o crescimento pode variar, apesar do consenso em relação ao tempo de duplicação ser em torno de 12 dias, a longa fase lag e a entrada na fase log após 60/90 dias em todos os modelos (SHEPARD, 1971; LEVY; JI, 2006).

Em microbiologia sabe-se que em algumas bactérias gram-positivas, e pelo menos em uma gram-negativa (*Coxiella bunetii*) descrita (OSWALD; THIELE, 1993), quando nutrientes essências são depletados, ou na presença de condições adversar, estruturas especializadas de

"repouso" são desenvolvidas pelo processo de esporulação, onde ocorre formação de uma estrutura intracelular (endósporo) composta por um revestimento que envolve o cromossomo bacteriano, pequenas quantidades de RNA, ribossomos e algumas enzimas e moléculas importantes para retomar o metabolismo quando as condições voltarem ser favoráveis. Essa estrutura intracelular não apresenta reações metabólicas, e a depender da espécie pode estar localizada na extremidade ou próximo a ela, ou centralmente (TORTORA; FUNNKE; CASE, 2005). Embora nossos dados, assim como, as informações da literatura em relação a morfologia, e comportamento do *M. leprae* nos diferentes modelos e tentativas de cresce-lo in vitro, nos chame atenção sobre a possibilidade de uma forma de resistência para ele, o mecanismo de esporulação ainda não foi descrito para micobacterias e algumas evidências mostram que genes clássicos envolvidos neste mecanismo não são conservados nesse gênero (TRAAG, 2009), porém isso não afasta a possibilidade de que o *M. leprae* apresente uma forma de resistência com alguma semelhança.

Na tentativa de se observar um sinal molecular específico de divisão celular, desenvolvemos uma RT-PCR para o alvo FtsZ do *M. leprae*. O produto proteico do gene FtsZ é requerido na fissão binária de muitos procariontes, bem como em algumas organelas eucarióticas e é responsável pelo recrutamento dos outros componentes do anel contráctil formado no início do processo de fissão (MARGOLIN, 2005; HONG; DENG; XIE, 2013), sendo essencial para a divisão bacteriana, inclusive sendo alvo de drogas para tratamento da tuberculose (LIN, et al., 2018).

O par de primers desenhado com auxílio do programa *Primer3* e com NCBI-BLAST, mostrou especificidade para as amostras de DNA do *M. leprae*, não apresentando amplificação nas amostras humanas de cDNA e DNA genômico. Quando as amostras de cDNA sintetizadas a partir do RNA extraído dos explantes foram testadas não apresentaram amplificação para o alvo FtsZ, este resultado pode representar ausência da expressão desse gene nas amostras, ou nível de expressão abaixo do detectável pelo protocolo aplicado.

Não podemos afirmar que o protocolo de amplificação usado para os *primers* FtsZ foi ideal para detectar o alvo nas amostras de cDNA do trabalho, uma vez que para os testes tivemos apenas amostra de DNA postiva e nenhuma amostra de cDNA como controle para a reação, o

controle deveria ser cDNA sintetizado a partir de uma amostra com maior probabilidade de conter bacilos em divisão. Usamos junto com as amostras dos explantes uma amostra de cDNA sintetizada a partir de uma alíquota da mesma suspensão de bacilos da inoculação dos explantes, que foi separada para extração de RNA no momento da inoculação. Considerando a aparente diminuição do metabolismo dos bacilos em D0 já discutida, e que a expressão gênica do FtsZ ocorre no início do processo de divisão celular e rapidamente desaparece (GARRIDO, et al.,1993) esse produto gênico poderia não estar mais presente na amostra de suspensão bacilar testada, não sendo uma amostra adequada para a validação do protocolo.

No modelo testado neste trabalho, para se avaliar padrão de replicação celular novas abordagens deverão ser realizadas, acreditamos que a inoculação de uma quantidade maior de bacilos (>10⁴) também poderia influenciar na qualidade da análise. Entretanto, diante de nossos dados de PCR, fica evidente que bacilos metabolicamente ativos permaneceram nos explante ao longo dos 60 dias em cultura no hOSEC.

Com a confirmação de que bacilos viáveis foram mantidos por até 60 dias no hOSEC, nossa pergunta foi se esses bacilos ainda guardavam capacidade de infectar o modelo *in vivo*, e isso foi demostrado com a identificação de bacilos nas patas dos camundongos nude inoculados com suspensão dos explantes mantidos na cultura por 28 e 60 dias.

Embora 22% dos camundongos nude tenham ido a óbito antes do tempo de análise, e grande parte dos animais inoculados com suspensão do dia 28 (59%) não terem amostras avaliadas por RT-PCR, amostras de patas inoculadas com suspensão de 5 experimentos independentes (Pele1-D60, Pele3-D28, Pele3-D60, Pele4-D28, Pele4-D60) apresentaram análises positivas, sendo que apenas os animais inoculados com suspensão de Pele1-D28, e Pele2-D28, não apresentaram positividade em nenhuma análise das patas (Tabelas 7, 8, 9 e 10). Com esses dados fica notório que é possível manter *M. leprae* no hOSEC por até 60 dias mantendo sua capacidade de infectar o animal.

Embora a suspensão inoculada nos explantes da pele 4 (masculina) tenha sido um pouco menor que das outras peles (Pele 4 = 1×10^4 ; Pele 1, 2, 3 = $1,5 \times 10^4$), houve maior positividade nos camundongos, inclusive com positividade na análise de RT-PCR para RNA ribossomal, mostrando a viabilidade dos bacilos nas patas após 5 meses de inoculação em 52,9% dos animais.

Não há como afirmarmos se foi o menor número de bacilos inoculados nos explantes da Pele 4, que possibilitou maior êxito na possível proliferação dos bacilos durante o tempo de cultura, o que poderia ter gerado inóculos com maior número de bacilos para inoculação nos camundongos, ou se a pele 4 por ser de indivíduo masculino possui características mais favoráveis para o bacilo se multiplicar e/ou se manter viável e/ou infectivo. A avaliação da viabilidade relativa e a PCR RLEP não foi realizada nos explantes da Pele 4.

Dados epidemiológicos mostram que homens são mais afetados pela hanseníase do que as mulheres, dados do boletim de Vigilância em Saúde do ministério da saúde de 2012 a 2016, mostram que a taxa detecção de hanseníase foi maior para o sexo masculino em todas as faixas etárias, além disso a proporção de doentes multibacilares entre os homens é de 62,7% enquanto para mulheres é de 37,3%.

Alguns autores associam a maior taxa de doentes do sexo masculino, e maior taxa de multibacilares, geralmente pela maior exposição ao bacilo ou ainda pelo menor cuidado dispensado à saúde por parte dos homens, o que retardaria o diagnóstico da doença, que quando realizado já seriam casos mais avançados e com índices baciloscópicos mais elevados (NOBRE, et al., 2017). Porém, os indivíduos do sexo masculino de muitas espécies são mais suscetíveis do que os do sexo feminino a infecções causadas por certos parasitas, fungos, bactérias e vírus (KLEIN, 2000), e nos humanos, assim como em outros animais, os hormônios esteroides (especialmente os andrógenos e estrogênios), exercem propriedades imunomoduladoras. Na tuberculose, é relatado, que os estrôgenos femininos direcionam a reposta pró-inflamatória Th-1, e a testosterona por outro lado a inibe, sendo que a contenção da micobacteria, e produção de citocinas pró-inflamatórias é mais eficiente nos indivíduos do sexo feminino (BINI, 2014).

Quanto a pele sabemos que ela atua na resposta imune, os queratinócitos que representam cerca de 95% da celularidade da epiderme, possuem receptores de reconhecimento padrão (PRRs), são fonte potente de citocinas, quimiocinas, inclusive com papel na imunidade da hanseníase (TELES, et al., 2001; LYRIO, 2015). Em nosso estudo não temos dados suficientes para debater sobre a possível influência da pele masculina na viabilidade dos bacilos nos explantes.

A expressão de citocinas nos explantes inoculados com bacilos é um vasto campo a ser investigado, por ora temos os dados da expressão gênica de TGF- β nas peles femininas, que

interessantemente se mostrou inibida nos explantes das Peles 1 e 2 quando inoculados com os bacilos em comparação aos explantes inoculados apenas com salina (Figura 30, gráfico 15).

Os membros da família TGF-β são citocinas multipotentes que estão envolvidas em muitos processos celulares, incluindo diferenciação celular, embriogênese, carcinogênese, cicatrização de feridas e a regulação imunológica, exibem efeito pleiotrópico na variedade de funções biológicas, podendo exibir efeito pró-inflamatório e antiinflamatório (FUJIO, 2016).

O TGF-β é associado a inibição da atividade de macrófagos contra patógenos intracelulares (BARRAL-NETO, et al., 1992; TSUNAWAKI, 1988). E na hanseníase os maiores níveis de TGF-β estão relacionados aos pacientes do polo virchowiano, associado ao mecanismo de evasão da micobacteria, promovendo menor habilidade dos macrófagos em conte-la; pacientes do polo tuberculóide tendem apresentar menos TGF-β nas lesões, assim como menor produção dessa molécula quando suas células mononucleares do sangue periférico (PBMC) são estimuladas in vitro (GOULART; MINEO; FOSS, 2000; GOULART; PENNA; CUNHA, 2002).

Na cicatrização, evento que certamente está sendo estimulado no explante em cultura como já observado por MENDOZA-GARCIA et al. (2015), o TGF-β aumenta a força de contração da ferida e estimula o crescimento de células epiteliais in vivo (CLARK; COKER, 1998), pode induzir os queratinócitos epidérmicos a expressar integrinas que facilitam o componente migratório da reepitelização, e é produzido por fibroblastos, queratinócitos, e pelos monócitos e macrófagos infiltrantes (GAILIT; WELCH; CLARK, 1994). Sobre a influência dos bacilos na expressão do TGF-β no hOSEC outras análises deverão ser realizadas para uma melhor discussão e elucidação desse evento.

Esse trabalho levanta muitas questões a serem esclarecidas e mostra pontos metodológicos que ainda precisam ser melhorados, porém, há evidências de que o modelo funciona, mantendo o *M. leprae* viável e infectivo, e isso torna-se mais consolidado quando aplicamos translacionalmente o modelo hOSEC para a inoculação de amostras clínicas.

As amostras clínicas que foram usadas advieram de pacientes que estavam em tratamento da hanseníase há pelo menos 1 ano com poliquimioterapia convencional, e que, no momento da coleta da amostra, ainda apresentavam lesões sinalizadoras de atividade da doença, sendo candidatos a pacientes com resistência ou recidiva.

A análise das suspensões obtidas de cada amostra e dos explantes pelo Fite-Faraco após o tempo de cultura evidenciou bacilos em todas as amostras e explantes, confirmando a extração de bacilos das amostras coletadas, além de inoculação e manutenção no explante.

Dos cinco pacientes, três (P1, P2 e P3) tiveram as amostras de hOSEC avaliadas por RT-PCR, e 2 deles apresentaram positividade após 28 e 33 dias em cultura. Esses hOSECs positivos foram inoculados com amostras obtido de raspado dérmico (P1) e de biópsia de pele (P2), evidenciando a efetividade do hOSEC em manter as suspensões clínicas obtidas de diferentes fontes de coleta.

Assim como visto para as suspensões experimentais, o hOSEC também manteve os bacilos da suspensão clínica viável e infectivas, como foi comprovado com a positividade do camundongo inoculado com a suspenção do hOSEC de 28 dias do P1.

Esses resultados abrem possibilidade de se padronizar o modelo hOSEC para testes de resistência a drogas com amostras de pacientes suspeitos de doença resistente, teste que atualmente é realizado com inoculação das amostras de pacientes em camundongos que recebem doses das drogas questionadas por período que vai de 6 a 12 meses, para então se obter o resultado. Em comparação com este modelo animal, que é uma técnica trabalhosa, morosa, cara e limitada para o estudo das interações do *M. leprae* com as células hospedeiras, o hOSEC embora requeira algum treinamento e cuidados inerentes de metodologias de cultura, pode vim a ser uma alternativa menos trabalhosa, que demande menos espaço, com minimização do uso de animais e com possibilidade de avaliar interação do patógeno com células do seu principal e natural hospedeiro.

Vários pontos podem ser aprimorados no sentido de melhorar a eficiência em manter o *M. leprae* no modelo hOSEC e avaliar a multiplicação bacilar. A quantidade de bacilos inoculados, e a temperatura de manutenção dos explantes são variáveis importantes que devem ser testadas. Em alguns trabalhos mais recentes com êxito na manutenção do bacilo viável e se dividindo, em Amoebas (WHEAT, et al., 2014), em meio NK260 suplementado com extrato de gema de ovo, piruvato, transferina e plasma humano (AMAKO, et al., 2016), e em linhagem celular de artrópodes (FERREIRA, et al., 2018), quantidades maiores de bacilos foram usadas, na ordem de 10⁷, além de usaram incubações em temperaturas em torno de 30º a 32º.

Modificações nesse sentido, além da suplementação do meio de cultivo do hOSEC com nutrientes que favoreçam o *M. leprae* e uso de compostos inibidores da resposta imune inata da pele são os próximos passos no estudo dessa metodologia, porém, pela primeira vez na literatura, nossos resultados demonstraram com sucesso que é possível manter o *M. leprae* viável no modelo de pele humana *ex vivo* por até 60 dias, tanto a partir de amostras laboratoriais quanto clínicas, importante passo no desenvolvimento de modelos experimentais para estudos da biologia do *M. leprae* e suas interações, além de clínicos, como imunologia e susceptibilidade a drogas.

Conclusão

 - A pele no modelo hOSEC mantém características de viabilidade e manutenção basal da sua estrutura por até 60 dias;

- Durante pelo menos 60 dias é possível manter os bacilos *M. leprae* viáveis no modelo *ex vivo*;

- Após cultivo no hOSEC, por 28 e 60 dias, os bacilos guardam capacidade de infectar o animal, modelo *in vivo*;

- A pele de indivíduo masculino pode apresentar condições mais favoráveis para a manutenção do bacilo nesse modelo;

- A expressão gênica de TGF- β é ativada no hOSEC, e o *M. leprae* inoculado na pele inibe essa expressão;

- O hOSEC pode ser um modelo para inoculação de amostras clínicas além de amostras experimentais;

- A multiplicação do bacilo neste modelo ainda precisa ser melhor averiguada;

Em conjunto, os dados deste trabalho mostram que é possível manter o bacilo *M. leprae* viável no modelo *ex vivo* hOSEC, e que este modelo pode ser um promissor método para o estudo do bacilo, abrindo um leque de possibilidades no que diz respeito ao estudo da biologia do bacilo e de terapêutica.

Referências

Abrahams, P. H.; Craven, J. L.; Lumley, J. S. P. The struture of te body - the systems and organs. **Illustrated clinical anatomy**, New York: Oxford University Press, p. 2-20, 2005.

Amako, K. et al. Non-exponential growth of *Mycobacterium leprae* Thai-53 strain cultured in vitro. **Microbiol Immunol**, v. 60, p. 817–823, 2016.

Andrade, T. A. et al. Ex vivo model of human skin (hOSEC) as alternative to animal use for cosmetic tests. **Procedia Engineering**. v. 110, p. 67 – 73, 2015.

Azevedo, M. C. S. et al. qPCR detection of *Mycobacterium leprae* in biopsies and slit skin smear of different leprosy clinical forms. **Braz J Infect Dis**, v. 21, n. 1, p. 71–78, 2017.

Baque, R. H. et al. A real-time RT-PCR method to detect viable Giardia lamblia cysts in environmental waters. **Water Res**. v. 45, n. 10, p. 3175-84, 2011.

Baker, C. J. The In Vitro Culture of the Leprosy Bacillus. International Journal of Leprosy, v. 51, n.3, p. 397-403, 1981.

Balamayooran, G. et al. The armadillo as an animal model and reservoir host for *Mycobacterium leprae*. **Clinics in Dermatology,** v. 33, p. 108–115, 2015.

Barral-Netto, M. et al. Transforming Growth Factor- β in Leishmanial Infection: A Parasite Escape Mechanism. **Science. New Series**, v. 257, n. 5069, p. 545-548, 1992.

Bathia, A. S. et al. Clinical and histopathological correlation in the classification of leprosy. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 61, p. 433–8. 1993.

Bechler R. G. Hansen versus Neisser: controvérsias científicas na 'descoberta' do bacilo da lepra. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 3, p. 815-841, 2012.

Binford, C. H. The inoculation of human leprosy in the chimpanzee initiation of a long-term project. **Int J Lepr**. v. 33. n. 3, p. 666-8, 1965.

Binford, C. H. Histiocytic granulomatous mycobacterial lesions produced in the golden hamster (Cricetus auratus) inoculated with human leprosy. **Lab. Invest**, p. 901-924, 1959.

The Influence of Sex Steroid Hormones in the Immunopathology of Experimental Pulmonary Tuberculosis. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93831, 2014.

Birchall, J. et al. Cutaneous DNA delivery and gene expression in *ex vivo* human skin explants via wet-etch microfabricated microneedles. **J Drug Target.** v. 13, n. 7, p. 415-21. 2005.

Bjorn, A. et al. Do mycobacteria produce endospores? **PNAS**, v.107, n. 2, p. 878–881, 2010.

van den Bogaart, E. et al. Duplex quantitative Reverse-Transcriptase PCR for simultaneous assessment of drug activity against Leishmania intracellular amastigotes and their host cells. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. v. 4, n. 1, p. 14-9, 2013.

Boletim Epidemiológico Secretaria de vigilânia em saúde – Ministério da saúde, v. 49, n. 4, 2018.

Borges, G. R., Hepp, D., Nonohay, J. S. A influência da temperatura sobre a degradação do DNA em tecidos animais. In: 16ª MOSTRA DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DO INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO RIO GRANDE DO SUL CAMPUS PORTO ALEGRE, 2015 Porto Alegre. **16ª Mostra de Pesquisa, Ensino e Extensão do IFRS Campus Porto Alegre**, 2015. p. 133-133.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase**. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 54 p. Série A. Normas e Manuais Técnicos.

Cambau E., et al. Multidrug-resistance to dapsone, rifampicin, and ofloxacin in *Mycobacterium leprae*. Lancet. v. 349, n.9045, p. 103-4. 1997.

Cambier, C. J. et al. Phenolic Glycolipid Facilitates Mycobacterial Escape from Microbicidal Tissue-Resident Macrophages. Immunity. **Immunity**, v. 47, n. 3, p. 552-565, 2017.

Catarino, C. M., et al. Skin corrosion test: a comparison between reconstructed human epidermis and full thickness skin models. **Eur J Pharm Biopharm**. V. 125, p. 51-57, 2018.

Castro, N., Gillespie, S. R., Bernstein, A. M. Ex Vivo Corneal Organ Culture Model for Wound Healing Studies. J. Vis. Exp, n. 144, 2019.

Chae G. T., et al. DNA-PCR and RT-PCR for the 18-kDA gene of *Mycobacterium leprae* to assess the efficacy of multi-drug therapy for leprosy. **J Med Microbiol**, v. 51, p. 417–422, 2002.

Chen, J. Q., et al. Production of human insulin in an*E. coli* system with Met-Lys-human proinsulin as the expressed precursor. **Appl Biochem Biotechnol**, v. 55, p. 5:15, 1995.

Clarka D. A., Coker R. Transforming growth factor-beta (TGF- β). The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, v. 30, p. 293-298, 1998.

Coelho, E.G.A. et al. Comparação entre métodos de estocagem de DNA extraído de amostras de sangue, sêmen e pêlos e entre técnicas de extração. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v. 56, n. 1, p. 111-115, 2004.

Cole S. T. et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. **Nature**, v. 393, p. 537-544, 1998.

Cole, S. T. et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. **Nature**. v. 409, n. 6823, p. 1007-11, 2001.

Colston, M. J.; Hilson G. R. F. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. **Nature**, London, v.262, p. 399-401, 1976.

Companjen, A. R. et al. A modified ex vivo skin organ culture system for functional studies. *Arch Dermatol Res*, v. 293, n. 4, p. 184-90, 2001.

Couret, M. The behavior of bacillus leprae in cold-blooded Animals. **Jour. Exper. Med**. v. 12, n. 649, p. 576-589, 1910.

Cowdry, E. V. Cytological studies on globi in leprosy. **The American Journal of Pathology**, v. 16. n. 2, p. 136.9, 1940.

Danso, M. O. et al. An ex vivo human skin model for studying skin barrier repair. **Exp. Dermatol**, v.24, n. 1, p. 48-54, 2014.

Eiglmeier, et al. Use of an ordered cosmid library to deduce the genomic organization of *Mycobacterium leprae*. **Mol. Microbiol**. v. 7, p. 197–206, 1993.

Estrada-G I. C. E. Partial Nucleotide Sequence of 16s Ribosomal RNA Isolated from Armadillogrown *Mycobacterium leprae*. Journal of General Microbiology, v. 134, 1449-1453, 1988.

Fagundes, D. J.; Taha, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 1, p. 59-64, 2004.

Fell H. B. Tissue culture and its contribution to biology and medicine. **J Exp Biol**, v. 57, n. 1, p. 1-13, 1972.

Ferreira, L. M.; Hochman, B.; Barbosa, M. V. J. Modelos experimentais em pesquisa. Acta Cir Bras, v. 2, p. 28-34, 2005.

Ferreira J. S. et al. Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: Use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, p. 1-25, 2018.

Fite, G. L.; Cambre, F. J.; Turner, M. H. Procedures for demonstrating lepra bacilli in paraffin sections. **Archives of Pathology**, v. 43, p. 624-625, 1947.

Fleischmann, R. D. et al. Whole-Genome Comparison of *Mycobacterium tuberculosis* Clinical and Laboratory Strains. J. Bacteriol, v. 184, 5479-90, 2002.

Fleury, R. N. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling: uma análise morfológica. **Hansenologia internationalis**, v. 14, p. 101-106, 1989.

Frade, M. A. C. et al. Prolonged viability of human organotypic skin explant in culture method (hOSEC). **An Bras Dermatol**, v. 90, n. 3, p. 347-50, 2015.

Fujio, K. et al. Revisiting the regulatory roles of the TGF- β family of cytokines. **Autoimmunity Reviews**, v. 15, p. 917–922, 2016.

Gailit, J., Welch, M. P., Clark, R. A. F. TGF-fit Stimulates Expression of Keratinocyte Integrins During Re-Epithelialization of Cutaneous Wounds. J Invest Dermatol, v. 103, p. 221-227, 1994.

Garbino, J. A., Patologia e Manifestações Viscerais. In: OPROMOLLA, Diltor Vladimir Araujo, (ed). **Noções de Hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato", p. 63-71, 2000.

Garrido, T. et al. Transcription of ftsZ oscillates during the cell cycle of Escherichia coli. **EMBO Journal**, v.12, n. 10, p. 3957-3965, 1993.

Gartner, L. P., Hiatt, J. L. Color Texbook of Histology. 3rd ed. Philadelphia: Saunders. 2007. p 328.

Goulart, I. M. B.; Mineo, J. R.; Foss, N. F. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. **Clin Exp Immunol**, v. 122, n. 3, p. 330–334, 2000.

Goulart, I. M. B.; Penna, G. O.; Cunha, G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 35, n. 4, p. 365-375, 2002.

Green, H. Terminal Differentiation of Cultured Human Epidermal Cells. **Cell**, v. 11, p. 405-416, 1977.

Habif, T.P. Principiples of diagnosis and anatomy. **Clinical Dermatology: a color guide to diagnosis and therapy**. 3ªed. Missouri: Von Hoffman Press. 1996. p.1-24.

Hansen, A.; Looft, C. Leprosy: in its Clinical & Pathological Aspects. **Translated by Norman Walker**, M.D. Pp. xi., 162. Bristol: John Wright & Co. p. 73-74,1895.

Hastings, R. C.et al. Leprosy. Clinical Microbiology Reviews, v. 3, n. 1, p. 330-348, 1988.

Hong, W; Deng, W.; Xie, J. The Structure, Function, and Regulation of Mycobacterium FtsZ. **Cell Biochem Biophys**. v. 65, n. 2, p. 97-105, 2013.

Honore, N.; Cole, S. T. Molecular basis of rifampin resistance in *Mycobacterium leprae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 37, n. 3, p. 414–418, 1993.

Ishaque, M. Direct evidence for the oxidation of palmitic acid by host grown *Mycobacterium leprae*. **Res. Microbiol**. v. 140, p. 83-93, 1989.

Ishaque, M. Growth of *Mycobacterium leprae* under low oxygen tension. **Microbios**, v. 64, n. 258, p. 7-17, 1990.

Ishaque, M. Attempts to Grow *Mycobacterium leprae* in a Medium with Palmitic Acid as the Substrate. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v. 61, n. 2, p. 294-6, 1993.

Jacobs, J.; Lehé, C.; Hasegawa, H. Skin irritants and contact sensitizers induce Langerhans cell migration and maturation at irritant concentration. **Experimental Dermatology**. v. 15.p. 432-440, 2006.

Jacobson. R. R.; Hastings, R. C. Rifampin-resistant leprosy. Lancet. v. 11; p. 1304-5, 1976.

Jörgens, V. Oskar Minkowski (1858-1931). An outstanding master of diabetes research. **Hormones (Athens)**, v. 5, n. 4, p. 310-311, 2006.

Junqueira L.C., Carneiro J. Histologia Básica. 2004. 10ed., p.359.

Kai, M, et al. Diaminodiphenylsulfone resistance of *Mycobacterium leprae* due to mutations in the dihydropteroate synthase gene. **FEMS Microbiology Letters**, v. 177, p. 231-235, 1990.

Karanth, S. S. et al. Time-related decrease of substance P and CGRP in central and peripheral projections of sensory neurones in *Mycobacterium leprae* infected nude mice: a model for lepromatous leprosy in man. **J. pathol**, v.160, p. 335-45, 1990.

Kirchheimer, W.F., Storrs, E. E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. **International Journal of Leprosy and OtherMycobacterial Diseases**, 1971. v. 39, n. 3, p. 693–702.

Kitagawa, N. et al. Inhibition of JNK in HaCaT cells induced tight junction formation with decreased expression of cytokeratin 5, cytokeratin 17 and desmoglein 3. **Histochem Cell Biol**, v.142, n.4, p. 389-99. 2014.

Klein, S. L. The effects of hormones on sex differences in infection: from genes to behavior. **Neurosci Biobehav Rev.** v. 24, n.6, p. 627-38, 2000.

Kohsaka, K.; Mori, T.; Ito T. Lepromatoid lesion developed in the nude mouse inoculated with *Mycobacterium leprae*. **La Lepro**. v. 45, p. 177-187, 1976.

Kurabachew, M.; Wondimu, A.; Ryon J. J. Reverse Transcription-PCR Detection of *Mycobacterium leprae* in Clinical Specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 5, p. 352–1356, 1998.

Lahiri, R., Randhawa, B.; Krahenbuhl, J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 235–242, 2005.

Lavania, M. et al. Detection of viable *Mycobacterium leprae* in soil samples: insights into possible sources of transmission of leprosy. **Infect Genet Evol**, v. 8, p. 627–631, 2008.

Lastória, J. C; Abreu, M. A. M. M. Leprosy: a review of laboratory and therapeutic aspects - Part 2. **An. Bras. Dermatol**. v. 89, n. 3. 389-403, 2014.

Lebonvallet, N. et al. The evolution and use of skin explants: potential and limitations for dermatological research. **Eur J Dermatol**. v. 20, p. 671-84, 2010.

Levítico. As doenças da pele. Cap. 13. Bíblia.

Levy, L.; Ji, B. The mouse foot-pad technique for cultivation of *Mycobacterium leprae*. Lepr Rev, v. 77, p. 5–24, 2006.

Lima, J. P. C.; Arantes, M. Cultura do bacilo da lepra. **Trabalho do instituto bacteriologico de s. Paulo**. p. 391-394. 1939.

Lima, M. S. Cultura do *Mycobacterium leprae* (Verificação dos Trabalhos de Vaudremer). Trabalho do Laboratório de Bacteriologia e Sorologia do Departamento de Prophylaxia da Lepra. São Paulo. 133-140, 1937. Lin, Y. et al. Identification of TB-E12 as a novel FtsZ inhibitor with anti-tuberculosis activity. **Tuberculosis (Edinb**), v. 110, p. 79-85, 2018.

Lyrio, E. C. D. et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with the HaCaT human keratinocyte cell line: new frontiers in the cellular immunology of leprosy. **Experimental Dermatology**, v. 24, p.536–542, 2015.

Livak, K. J.; Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, p. 402–408, 2001.

Lutz, A. Sobre a morfologia do microrganismo da lepra. In: **Adolpho Lutz-obra completa**, Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2004, v. 1, p. 247-260, livro 2.

Eloah, C.D. et al. Interaction of *Mycobacterium leprae* with the HaCaT human keratinocyte cell line: new frontiers in the cellular immunology of leprosy. **Experimental Dermatology**, v. 24, p. 536–542, 2015.

Macieira, S. Aspectos microbiológicos do *Mycobacterium leprae*. In: OPROMOLLA, Diltor Vladimir Araujo, (ed). **Noções de Hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato", p. 13-18, 2000.

Madeira, S.; Rosa, P. S. Hanseníase Experimental. In: OPROMOLLA, Diltor Vladimir Araujo, (ed). **Noções de Hansenologia**. Bauru: Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato", p. 19-26, 2000.

Magidan, C. A. et al. A Macrophage Response to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. **Cell**, v. 170, n. 5, p. 973-985, 2017.

Margolin, W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 6, n. 11, p. 862–871, 2005.

Martinez, A. N. et al. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of realtime PCR. J Clin Microbiol. v. 47, p. 2124–2130, 2009.

Martinez, F. O.; Helming, L.; Gordon, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**. v. 27, p. 451-83, 2009.

Martinez, A. N. et al. Evaluation of qPCR-Based Assays for Leprosy Diagnosis Directly in Clinical Specimens. **PLoS Negl Trop Dis.** v. 5, n. 10, p. 1-8, 2011.

Masaki T, et al. Reprogramming diminishes retention of *Mycobacterium leprae* in Schwann cells and elevates bacterial transfer property to fibroblasts. Version 2. F1000Research, p. 1-15, 2013.

Matoltsy, A. G.; Balsamo. C. A. A study of the components of cornified epithelium of human skin. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** v. 1, n. 4, p. 339-360, 1955.

Mattos, K. A. et al. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. **J Leukoc Biol**. v. 87, n. 3, p. 371-84, 2010.

McShane, H. et al. Enhanced Immunogenicity of CD4⁺ T-Cell Responses and Protective Efficacy of a DNA-Modified Vaccinia Virus Ankara Prime-Boost Vaccination Regimen for Murine Tuberculosis. **Infect Immun**. v. 69, n. 2, p. 681–686.

Medeiros, R. C. A. et al. Subversion of Schwann Cell Glucose Metabolism by *Mycobacterium leprae*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 291, p. 21375-21387, 2016.

Meyers, W. M.; Gormus B. J.; Walsh, G.P. Nonhuman Sources of Leprosy. International Journal of Leprosy, v. 60, n. 3, p. 477-480, 1992.

Mendoza-Garcia, J. et al. Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy. **Wound Rep Reg**, v.23, p. 685–702. 2015.

Michellin, L. B. et al. Leprosy patients: neurotrophic factors and axonal markers in skin lesions. **Arq Neuropsiquiatr**, v. 70, n. 4, p. 281-286, 2012.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase**, (Série A. Normas e Manuais Técnicos), Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

Monot, M., et al. On the Origin of Leprosy. Science, v. 308, p. 1040 – 1042, 2005.

Mohanty, P. S. et al. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**. v. 82, n.1, p. 23-72016

Morrissey, J.; Green H. Differentiation-related death of an established keratinocyte line in suspension culture. **Journal of Cellular Physiology**, v. 93, n. 3, p. 469-475, 1978.

Montenegro, R. A. et al. Assessment of messenger RNA (mRNA) of *Mycobacterium tuberculosis* as a marker of cure in patients with pulmonary tuberculosis. **J Appl Microbiol**. v. 117, n.1, p. 266-72, 2014.

Nakata, N.; Kai, M.; Makino, M. Mutation Analysis of the *Mycobacterium leprae folP1* Gene and Dapsone Resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 55, n. 2, p. 762–766, 2011.

Ng, V. et al. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. **Cell**. v. 103, n. 3, p. 511-24, 2010.

Nobre, M. L. et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. e0005364, 2017.

Noordeen, S. K. Elimination of leprosy as a public health problem. **Indian J Lepr**, v. 66, n.1, p. 1-10, 1994.

Obadia, D. L.; Verardino, G.; Alves, M.F.G.S. Hanseníase: Correlação Clínico-Histopatológica. **Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto, UERJ**. v. 10, n. 1, 2011.

Oswald, W.; Thiele, D. A sporulation gene in Coxiella burnetii? **Zentralbl Veterinarmed B**. v. 40, n. 5, p. 366-70, 1993.

Pandya, A. N; Tailor, H. J. Clinicohistopathological correlation of leprosy. Indian J Dermatol Venereol Leprol. v. 74, p. 174-6, 2008.

Pennacchi, P. C. et al. Glycated Reconstructed Human Skin as a Platform to Study the Pathogenesis of Skin Aging. **Tissue Eng Part A**. v. 21, n. 17-18, p. 2417-25, 2015.

Mohanty, P. S. Viability of *Mycobacterium leprae* in the environment and its role in leprosy dissemination. *Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology.* v. 82, n. 1, p. 23-27, 2016.

Nagy I., Kemény L. Skin Immune System. In: Revuz J., Roujeau JC., Kerdel F.A., Valeyrie-Allanore L. (eds) Life-Threatening Dermatoses and Emergencies in Dermatology. Springer, Berlin, Heidelberg. 2009. P. 29–42, 2009.

Negera, E. et al. The effects of Prednisolone Treatment on cytokine expression in Patients with erythema nodosum leprosum reactions. **Frontiers in Immunology**. V. 9, p. 1-15, 2018.

Nugraha, B. et al. Human Cardiac Organoids for Disease Modeling. Clinical Pharmacology & Therapeutics, v. 105, n. 1. 2009.

OxfordDictionaries.OxfordUniversityPress.Acesso:https://en.oxforddictionaries.com/definition/modelem 09/03/2019.<

Pinheiro, R. O. et al. *Mycobacterium leprae*–host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. **Future Microbiol**. v. 6, n. 2, p. 217–230, 2011.

Portaels, F. et al. Effects of Freezing and Thawing on the Viability and the Ultrastructure of in Vivo Grown Mycobacteria. **International Journal of Leprosy**, v. 56, n.4, p. 580-587, 1988.

Poumay, Y. et al. A simple reconstructed human epidermis: preparation of the culture model and utilization in vitro studies. **Arch Dermatol Res**, v. 296, n. 5, p. 203–211, 2004.

Rabe, J.H. et al. Photoaging: mechanisms and repair. J. Am. Acad, Dermatology. v. 55, n.1, p. 1-19, 2006.

Ranganatha, N.; Kuppast, A. review on alternatives to animal testing methods in drug development. **Academic Sciences**. v. 5, n. 5, p. 28-32. 2012.

Revista PESQUISA FAPESP 245 | 15 a 21. 2016. Acesso (http://revistapesquisa.fapesp.br/wp-content/uploads/2016/07/014-021_CAPA_Pele_245NOVO.pdf)

Rho, H-W. et al. Identification of valid reference genes for gene expression studies of human stomach cancer by reverse transcription-qPCR. **BMC Cancer**, p. 210:240, 2010.

Rice, R. H.; Green H. Presence in Human Epidermal Cells of a Soluble Protein Precursor of the Cross-Linked Envelope: Activation of the Cross-Linking by Calcium Ions. **Cell**, v. 18, p. 681-694, 1979.

Ridley, D. S.; Jopling, W. H. Classfication of leprosy according to immunity: a five-group system. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, v.34, p. 255-73, 1966.

Ridley, D.S. Skin biopsy in leprosy. **Documenta Geigy**. 3rd edition. CIBA-GEIGY Limited. Basle, Switzerland, 1990.

Rodrigues, L.C.; Lockwood, D.N. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. Lancet Infect Dis. v. 11, n. 6, p. 464-70, 1966.

Scollard, D. M. The Continuing Challenges of Leprosy. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, p. 338–381, 2006.

Silver, F, H.; Freewan, J. W.; Devore, D. Viscoelastic properties of human skin and processed dermis. **Skin. Res. Technol**. v.1, p. 18-23, 2001.

Shepard, C. C. Temperature Optimum of *Mycobacterium leprae* in Mice Communicable Disease. **J Bacteriol**, v. 90, n. 5, 1271-5, 1965.

Shepard, C.C. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into the foot pads of mice. **J. Exp. Med**. v. 112, p. 445-54, 1960.

Shepard, C.C.; McRae, D. H. A method for counting acid-fast bacteria. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**. v. 36, p. 78-82, 1968.

Shepard, C.C.; The First Decade in Experimental Leprosy. Bull. Org. mond. Santé Bull. Wid HUth Org. v. 44, p. 821-827, 1971.

Shimoji, Y. et al. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-2 and mediates Schwann cell invasion. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 96, n. 17, p. 9857-62, 1999.

Silva, C. A. M. et al., Interaction of *Mycobacterium leprae* with Human Airway epithelial Cells: Adherence, Entry, Survival, and Identification of Potential Adhesins by Surface Proteome Analysis. **Infection and Immunity**. v.81, n.7, p. 2645-1659, 2013.

Silva, A. T.; Macedo, P. M. Electron Microscopic Study of *Mycobacterium leprae* Membrane. **International Journal of leprosy**, v.51, n.2, p. 219-224, 1983.

Singh, P.; Cole, S.T. *Mycobacterium leprae*: genes, pseudogenes and genetic diversity. **Future Microbiol**, v. 6. n.1, p. 57–71, 2011.

Spierings, E.et al. Novel mechanisms in the immunopathogenesis of leprosy nerve damage: the role of Schwann cells, T cells and *Mycobacterium leprae*. **Immunol Cell Biol**. v. 78, n. 4, p. :349-55, 2000.

Spreca, A. et al. Immunocytochemical localization of S-100b protein in degenerating and regenerating rat sciatic nerves. **J Histochem Cytochem**. v. 37, n. 4, p. 441-6, 1989.

Sun, T. T.; Green, H. Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. **Cell**. v. 9, p. 511-521, 1976.

Souza-Araujo, H. C. Morfologia do *Mycobacterium leprae hominis* e do *M. leprae muris*. Estudo baseado na microscopia electrônica e de contraste de fases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 389-396, 1953.

Talhari, S. et al. Diagnóstico. In: Hanseníase. 4a ed. 2006. cap 10, p. 128-32.

Talhari, C.; Talhari, S.; Penna, G.O. Clinical aspects of leprosy. **Clinics in Dermatology**. v.33, p. 26–37, 2015.

Teles R M, et al. Differential TNF α mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. Arch Dermatol Res, v. 294, p. 355–362, 2002.

Tortora; Funnke; Case. Anatomia Funcional das células procarióticas e eucarióticas. **Microbiologia**, Cap. 4, p. 97-98, 8ª Edição, 2005.

Traag, B. A. et al. Do mycobacteria produce endospores? **PNAS**, v. 107, n. 2, p. 878–881, 2010.

Trombone, A. P. F. et al. Optimized Protocols for *Mycobacterium leprae* Strain Management: Frozen Stock Preservation and Maintenance in Athymic Nude Mice. Journal of Visualized **Experiments.** v.23, n. 85, 2014.

Truman, R. W.; Krahenbuhl, J. L. Viable *M. leprae* as a research reagent. Int J Lepr Other Mycobact Dis. v. 69, n.1, p. 1-12, 2001.

Truman, R. W. et al. Enumeration of *Mycobacterium leprae* Using Real-Time PCR. PLOS, p. 1-7, 2008.

Truman, R. W. et al. The Armadillo as a Model for Peripheral Neuropathy in Leprosy. **ILAR J**. v. 54, n.3, p. 304–314, 2014.

Tsunawaki, S. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . **Nature**. v. 21, n. 334, p. 260-2, 1988.

Turankar, R. P. et al. Survival of *Mycobacterium leprae* and association with Acanthamoeba from environmental samples in the inhabitant areas of active leprosy cases: A cross sectional study from endemic pockets of Purulia, West Bengal. **Infect Genet Evol**, pii: S1567-1348(19)30001-2, 2019.

Vandesompele, J. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**, v. 3, n.7, 2002.

Virchow, R. Die krankhaften Geschwulste. August Hirschwald, Berlin, 1863.

Xu W, et al. Application of a partial-thickness human ex vivo skin culture model in cutaneous wound healing study. **Laboratory Investigation**. v. 92, p. 584–599, 2012.

Wade, H. W. Introduction bacteriology of leprosy. Inter-regional postgraduate leprosy training c curse. Philippines. 1961.

Wang, H. et al. An in vitro model of *Mycobacterium leprae* induced granuloma formation. **BMC Infect Dis**. v. 20, n. 13:279, p: 1-10. 2013

Wen, Y. et al. Evaluation of Novel Tools to Facilitate the Detection and Characterization of Leprosy Patients in China. **BioMed Research International**. p. 1-7, 2014.

Williams DL, Gillis TP. **Molecular detection of drug resistence in** *Mycobacterium leprae*. Lepr Rev. v. 75, n. 2, p, 118-130, 2004.
WheaT, W. H. et al. Long-term Survival and Virulence of *Mycobacterium leprae* in Amoebal Cysts. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8. n.12, e3405, 2014.

WHO, World Health Organization. Global Leprosy Strategy: Accelerating towards a leprosy-free world. Estratégia mundial de eliminação da lepra 2016-2020: Acelerar a ação para um mundo sem lepra. 2015.

WHO, World Health Organization. Guidelines for the Diagnosis, Treatment and Prevention of Leprosy. 2017.

WHO, World Health Organization. 1987. Laboratory techniques for leprosy. Geneva.

WHO, World Health Organization. Weekly epidemiological record (http://www.who.int/wer/en/). № 35, 2017, 92, 501–520.

Wolcott RR. Exacerbation of Leprosy During Present Day Treatment. International Journal of Leprosy. 1953.

Worobec, S. M. Current approaches and future directions in the treatment of leprosy. **Res ReportsTrop**. *v*. 3, p. 79-91, 2012.

ANEXO 1 - Certificado de aprovação do comitê de ética em Pesquisa em seres humanos do HCRP e FMRP-USP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



Ribeirão Preto, 28 de setembro de 2016

Oficio nº 3269/2016 CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado "CULTURA ORGANOTÍPICA DE PELE PARA O CULTIVO DO MYCOBACTERIUM LEPRAE" – versão 3, de agosto/2016, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em sua 437ª Reunião Ordinária, realizada em 26/09/2016 e enquadrado na categoria: APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 2, de 19/08/2016, a solicitação de criação de Biorrepositório e o Termo de Consentimento para Guarda de Material Biológico, de acordo com o Processo HCRP nº 4005/2016.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comité segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^o. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

llustrissimos Senhores **NATALIA APARECIDA DE PAULA PROF.DR. MARCO ANDREY CIPRIANI FRADE(Orientador)** Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO Campus Universitário – Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP Registro Plataforma Bratil //CONEP nº 5440 (016) 3602-2228

www.hcrp.usp.br

cep@horp.usp.br

ANEXO 2 - Certificado de aprovação do comitê de ética no uso de animais



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 026/2015-1, sobre o projeto intitulado "Cultura organotípica de pele para o cultivo do Mycobacterium leprae", sob a responsabilidade do Professor Doutor Marco Andrey Cipriani Frade está de acordo com os Principios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi APROVADO em reunião de 29 de fevereiro de 2016.

We certify that the protocol nº 026/2015-1, entitled "Human organotypic skin explant culture to cultive of Mycobacterium leprae", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 02/29/2016.

Ribeirão Preto, 29 de fevereiro de 2016.



Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - (16)3315-3301