

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

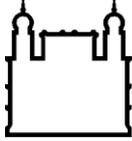
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Mestrado em Medicina Tropical

Identificação e caracterização fenotípica de subpopulações de neutrófilos de baixa densidade no eritema nodoso hansênico

Isabella Forasteiro Tavares

RIO DE JANEIRO

Janeiro/2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

Isabella Forasteiro Tavares

Identificação e caracterização fenotípica de subpopulações de neutrófilos de baixa densidade no Eritema Nodoso Hansênico

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical

Orientadora: Prof. Dra. Veronica Schmitz Pereira

RIO DE JANEIRO

Janeiro/2019

Tavares, Isabella Forasteiro.

Identificação e caracterização fenotípica de subpopulações de neutrófilos de baixa densidade no Eritema Nodoso Hansênico / Isabella Forasteiro Tavares. - Rio de Janeiro, 2019.

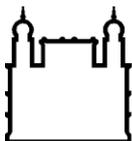
94 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientadora: Veronica Schmitz Pereira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Hanseníase. 2. Neutrófilos. 3. Eritema Nodoso Hansênico. 4. Subpopulação. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Medicina Tropical

Isabella Forasteiro Tavares

Identificação e caracterização fenotípica de subpopulações de neutrófilos de baixa densidade no Eritema Nodoso Hansênico

Orientadora: Prof. Dra. Veronica Schmitz Pereira

Aprovada em: 28/01/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Rafael Mariante Meyer (IOC/Fiocruz)

Prof. Dra. Thais Porto Amadeu (UERJ)

SUPLENTES:

Prof. Dra. Luciana Silva Rodrigues (UERJ)

Prof. Dr. José Augusto da Costa Nery (IOC-Fiocruz)

Rio de Janeiro, Janeiro de 2019.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Dra. Veronica Schmitz Pereira por mais essa oportunidade e parceria que se estende desde a iniciação científica. Obrigada pela confiança, dedicação, paciência, pelos conselhos e até mesmo pelos puxões de orelha quando necessários. Sem sua orientação, estando sempre ao meu lado eu jamais teria conseguido passar por esse período com tanta tranquilidade;

Agradeço em especial aos meus pais, Suely e Washington, e à minha irmã Suelen. Obrigada por serem meus exemplos e acreditarem em mim me dando todo incentivo e apoio possível para que eu chegasse até aqui. Toda a preocupação, dedicação, carinho e amor de vocês me fizeram a pessoa que sou hoje. É imprescindível saber que posso contar com vocês para absolutamente tudo! Sem o conforto de vocês isso não seria possível!

Agradeço também à todos os meus familiares que sempre torceram e se orgulham de mim;

Aos amigos que iniciaram junto comigo essa jornada chamada pós-graduação: Ingrid, Igor, Helver, Érica, Filipe, Mariana, Pedro, Priscila, Patrick, Viviane, Flávia, Daniel e Ana Carolina;

Ao Laboratório da Hanseníase, além de todos os funcionários do pavilhão pela amizade e por estarem sempre dispostos a me ajudar a qualquer momento;

Em especial agradeço a Thais, Jéssica, Fabiana e Camila que além de amigas de bancada, são minhas amigas de vida. Obrigada por todas as conversas e pelos momentos de distração, além de sempre aturarem meu mal humor, minhas reclamações e momentos de cansaço;

A equipe do ambulatório Souza Araújo, e especialmente ao Dr. José Augusto, pelo apoio e disposição essencial durante o recrutamento dos pacientes;

Aos pacientes por aceitarem participar deste trabalho;

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical pelas aulas e ensinamentos. Em especial à Coordenadora Dra. Martha Cecília Suárez Mutis;

À Dra. Mariana Gandini pela colaboração, por todos os conselhos e por estar sempre disposta a ouvir e esclarecer todas as minhas dúvidas sobre citometria;

Ao Dr. Rafael Mariante pela ajuda, colaboração e tempo investidos no projeto para que conseguíssemos realizar as análises por microscopia eletrônica. Agradeço por estar sempre disposto quando eu precisei;

Às plataformas de citometria e microscopia eletrônica de transmissão;

Ao Laboratório de Pesquisas sobre o Timo – IOC/Fiocruz por me deixar utilizar o cytopspin todas as vezes em que foram necessárias;

Às agências de fomento IOC, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa dissertação;

Por fim, meu agradecimento a todos que direta ou indiretamente colaboraram com o trabalho.

Sumário

Lista de Abreviaturas	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
Resumo	xv
Abstract	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Aspectos gerais da hanseníase	1
1.1.1. Epidemiologia	1
1.1.2. Agente etiológico	2
1.1.3. Transmissão e diagnóstico	5
1.1.4. Classificação clínica da hanseníase	6
1.1.5. Reações hansênicas	9
1.1.6. Tratamento	10
1.2. Eritema Nodoso Hansênico.....	11
1.3. Neutrófilos	14
1.3.1 Geração e liberação na corrente sanguínea	14
1.3.2 Mecanismos de ação direta contra patógenos	16
1.3.3 Subpopulações	19
1.3.3.1 Neutrófilos de baixa densidade	22
2. OBJETIVOS.....	27
2.1. Objetivo geral	27
2.2. Objetivos específicos	27
3. MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1. Desenho experimental	28
3.2. Considerações éticas	29
3.3. Escala de gravidade do ENH	29

3.4.	Processamento do sangue para obtenção de LDN e HDN	30
3.5.	Análise morfológica das subpopulações de neutrófilos	30
3.6.	Citometria de fluxo multiparamétrica	32
3.7.	Estratégia de análise	33
3.8.	Dosagem de MMP-9 sérica por ELISA	34
3.9.	Geração de LDNs <i>in vitro</i>	34
3.10.	Análise estatística	34
4.	RESULTADOS.....	36
4.1.	Classificação dos pacientes com ENH incluídos no estudo	36
4.2.	Presença de LDNs circulantes em pacientes com ENH	38
4.3.	LDNs elevados no ENH estão relacionados à gravidade da reação	41
4.4.	LDNs de pacientes com ENH possuem fenótipo mais ativado e a talidomida modula esse perfil	45
4.5.	LDNs surgem através de degranulação	49
4.6.	<i>M. leprae</i> induz geração de LDNs <i>in vitro</i>	51
5.	DISCUSSÃO	55
6.	CONCLUSÕES	63
7.	REFERÊNCIAS	65
8.	ANEXOS	79
8.1.	Ficha da escala de severidade	79

Lista de abreviaturas

AF	Alexa Fluor
BAAR	Bacilo álcool-ácido resistente
BB	<i>Borderline-borderline</i>
BL	<i>Borderline-lepromatoso</i>
BSA	Albumina sérica bovina
BT	<i>Borderline-tuberculoide</i>
CD	<i>Cluster</i> de diferenciação
Cy	Cianina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ENH	Eritema nodoso hansênico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersão frontal da luz (<i>Forward Scatter</i>)
FSC-A	Dispersão frontal da luz que mede a área (<i>Forward Scatter-Area</i>)
FSC-H	Dispersão frontal da luz que mede a altura (<i>Forward Scatter- Height</i>)
G-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
G-MDSC	Célula supressora de origem mielóide granulocítica
HDN	Neutrófilo de alta densidade (<i>High density neutrophils</i>)
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IB	Índice baciloscópico
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IFN-γ	Interferon-gamma
IgG	Imunoglobulina G
ILB	Índice logarítmico da biópsia
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
Kg	Quilograma
LAM	Lipoarabinomanana
LDN	Neutrófilo de baixa densidade (<i>Low density neutrophils</i>)

LL	Forma polar lepromatosa
LPS	Lipopolissacarídeo
M	Molar
MB	Multibacilar
MDSC	Célula supressora de origem mielóide
MFI	Mediana de intensidade de fluorescência
mg	Miligrama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP-9	Metaloproteinase de matrix 9
MMP-2	Metaloproteinase de matrix 2
MO	Monócito
MPO	Mieloperoxidase
MS	Ministério da Saúde
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (<i>Neutrophil extracellular traps</i>)
NF-kB	Fator de transcrição nuclear kappa beta
NGS	Soro normal de cabra
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PB	Paucibacilar
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDL-1	Ligante de morte programada-1
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldeído
PGL-1	Glicolípídeo fenólico 1
PMN	Polimorfonuclear
PQT	Poliquimioterapia

PTX3	Pentraxina
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RR	Reação reversa
SSC	Dispersão lateral da luz (<i>Side Scatter</i>)
TGF-β	Fator de crescimento tumoral-beta
TLRs	Receptores semelhantes a <i>Toll</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF	Fator de necrose tumoral
TT	Forma polar tuberculóide
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WER	Boletim epidemiológico semanal (<i>Weekly epidemiological record</i>)
WHO	Organização Mundial de saúde (<i>World Health Organization</i>)
°C	Grau celsius

Lista de figuras

Figura 1.1: Número de novos casos de hanseníase no ano de 2017	2
Figura 1.2: Morfologia do <i>M. leprae</i> e seu cultivo em pata de camundongo	4
Figura 1.3: Resposta imunológica da hanseníase de acordo com os polos	8
Figura 1.4: Eritema Nodoso Hansênico	13
Figura 1.5: Formas de neutrófilos encontrados na circulação	15
Figura 1.6: Mecanismos usados por neutrófilos para a eliminação de microrganismos	19
Figura 1.7: Aumento no número de publicações sobre subpopulações de neutrófilos entre 1990 e 2018 no PubMed	20
Figura 1.8: Subpopulações de neutrófilos isolados através de gradiente de densidade	25
Figura 3.1: Esquema demonstrativo da estratégia de análise das citometrias de fluxo	33
Figura 4.1: Presença de LDNs no sangue periférico de pacientes com ENH	38
Figura 4.2: Análise da morfologia de LDNs e HDNs presentes no sangue periférico de pacientes ENH por microscopia eletrônica de transmissão	39
Figura 4.3: Presença de LDNs circulantes em pacientes ENH por citometria de fluxo	40
Figura 4.4: Pacientes ENH possuem mais células CD15 ⁺ CD14 ⁻	41
Figura 4.5: Frequência elevada de LDNs circulantes em pacientes ENH	43
Figura 4.6: Razão entre frequência de LDNs com a frequência de monócitos em pacientes com hanseníase e indivíduos saudáveis	44

Figura 4.7: Pacientes com ENH grave apresentam mais LDNs circulantes	45
Figura 4.8: Níveis de expressão dos marcadores de superfície CD11b, CD16, CD66b, CD62L e CD49d	46
Figura 4.9: Níveis de expressão dos marcadores de superfície CD11b, CD16, CD66b e CD62L pós início do tratamento com talidomida	48
Figura 4.10: Degranulação de MMP-9	49
Figura 4.11: Frequência de LDNs circulantes está correlacionada com a degranulação de MMP-9 <i>in vivo</i>	50
Figura 4.12: Aumento na frequência de LDNs gerados após infecção <i>in vitro</i> com <i>M. leprae</i>	52
Figura 4.13: Aumento na expressão de CD66b por LDNs gerados por estímulo <i>in vitro</i> com <i>M. leprae</i>	54
Figura 6.1: Proposta dos mecanismos envolvidos na geração de LDNs circulantes e seu papel no agravamento do ENH	64

Lista de tabelas

Tabela 1: Dados gerais de cada grupo de pacientes incluído no estudo	29
Tabela 2: Descrição dos anticorpos utilizados nas análises por citometria de fluxo	32
Tabela 3: Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes ENH incluídos no estudo.....	37

RESUMO

Identificação e caracterização fenotípica de subpopulações de neutrófilos de baixa densidade no Eritema Nodoso Hansênico

Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical
Isabella Forasteiro Tavares

O eritema nodoso hansênico (ENH) é considerado o quadro clínico mais grave da hanseníase. Atualmente o ENH é descrito como uma reação imunomediada por neutrófilos. Os pacientes com ENH apresentam leucocitose neutrofílica e a presença de neutrófilos nas lesões é um marco histológico importante no diagnóstico. Ainda assim, poucos trabalhos mostram o papel direto de neutrófilos no ENH. Evidências sugerem que uma subpopulação de neutrófilos de baixa densidade (LDNs, “low-density neutrophils”), presentes na fração de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) contribuam diretamente na patogênese e agravamento de diversas doenças como a sepse, lúpus e tuberculose. O objetivo deste estudo foi caracterizar a presença de LDNs circulantes na hanseníase e seu envolvimento no agravamento do ENH. Análises por microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e imunofluorescência, mostraram células segmentadas e hipersegmentadas com morfologia compatível à neutrófilos em PBMC de pacientes ENH. Dados obtidos por citometria de fluxo confirmaram a presença elevada de LDNs (CD14⁻CD15⁺) em pacientes ENH quando comparados à pacientes com hanseníase não reacionais. Além disso, nossos resultados mostram que há uma correlação entre a frequência de LDNs e a gravidade do quadro clínico dos pacientes ENH. Observamos que o aumento de LDNs em pacientes ENH tem relação com a diminuição de monócitos na fração de PBMC. A expressão elevada dos marcadores de ativação CD11b, CD16, CD66b e diminuição de CD62L e CD49d, sugere uma maior ativação dos LDNs nos pacientes ENH quando comparados à pacientes não reacionais. O tratamento com talidomida não interferiu na frequência de LDNs circulantes. Porém, reduziu a expressão dos marcadores de ativação, conseqüentemente, reduzindo o status de ativação dessas células. Através de ensaio imunoenzimático vimos um aumento nos níveis de MMP-9 (marcador de degranulação de neutrófilos) no soro de pacientes ENH. O aumento nos níveis séricos de MMP-9 foi correlacionado com o aumento na frequência de LDNs. Por fim, após análises *in vitro*, verificamos que o *M. leprae* é capaz de induzir a geração de LDNs em sangue total de indivíduos sadios. E o estímulo com *M. leprae* favorece o aumento na expressão de CD66b, receptor relacionado à atividade degranulatória, na superfície dos LDNs. Sendo assim, concluímos que pacientes ENH apresentam níveis elevados de LDNs circulantes com perfil ativado, e o aumento dessa subpopulação está relacionado à gravidade do ENH. Ademais, a presença do *M. leprae* favorece o aumento na frequência dessas células em sangue total. Esse dado, em conjunto com o aumento nos níveis de MMP-9 no soro e aumento na expressão de CD66b na membrana da célula, sugere que a degranulação pode ser a fonte de geração dos LDNs circulantes em pacientes com hanseníase. E esse mecanismo pode contribuir para a inflamação sistêmica associada ao ENH.

ABSTRACT

Identification and Phenotypic characterization of subpopulations of low density neutrophils in Erythema Nodosum Leprosum

Master Dissertation in Medicina Tropical
Isabella Forasteiro Tavares

Erythema nodosum leprosum (ENL) is considered the most severe clinical condition of leprosy. Currently, ENL is described as an immune reaction mediated by neutrophils. Patients with ENL have neutrophilic leukocytosis and the presence of neutrophils in the lesions is an important histological marker in the diagnosis. Still, few papers shows the direct role of neutrophils in ENL. Evidences suggests that a subpopulation of low-density neutrophils (LDNs), within the fraction of peripheral blood mononuclear cells (PBMC), directly contribute to the pathogenesis and severity of several diseases such as sepsis, lupus and tuberculosis. The aim of this study was to characterize the presence of circulating LDNs in leprosy and its involvement in the worsening of ENL. Analyzes by optical microscopy, transmission electron microscopy and immunofluorescence showed segmented and hypersegmented cells with morphology compatible to neutrophils in PBMC of ENL patients. Data obtained by flow cytometry confirmed the elevated frequency of LDNs (CD14⁺CD15⁺) in ENL patients when compared to patients with nonreactional leprosy. In addition, our results shows that there is a correlation between the frequency of LDNs and the severity of the clinical condition of ENL patients. We observed that the increase of LDNs in ENL patients is related to the decrease of monocytes on the PBMC fraction. Elevated expression of activation markers CD11b, CD16, CD66b and decreased expression of CD62L and CD49d, suggests a greater activation of LDNs in ENL patients when compared to nonreactional patients. Treatment with thalidomide did not interfered the frequency of circulating LDNs. However, it reduced the expression of the activation markers, consequently, reducing the activation status of these cells. Through an immunoenzymatic assay we have seen an increase in the levels of MMP-9 (neutrophil degranulation marker) on ENL patients serum. The increase in serum levels of MMP-9 is correlated with the increase frequency of LDNs. Finally, after *in vitro* analysis, we verified that *M. leprae* is able to induce generation of LDNs in whole blood of healthy individuals. Moreover, the stimulation with *M. leprae* favors CD66b expression increase, a receptor related to degranulatory activity, on the surface of LDNs. Thus, we conclude that ENL patients present higher levels of circulating LDNs with activated profile, and the increase of this subpopulation is related to the severity of ENL. In addition, the presence of *M. leprae* favors the increase in the frequency of these cells in whole blood. This data, among with the increase in serum MMP-9 levels and increase in CD66b expression in the cell membrane, suggests that the generation source of circulating LDNs in leprosy patients may be by degranulation. And this mechanism may contribute to the systemic inflammation associated with ENL.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Hanseníase

A hanseníase é uma doença de caráter infectocontagioso com evolução crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que atinge principalmente a pele e os nervos periféricos, na qual diante da falta de tratamento adequado pode levar a incapacidades físicas e motoras permanentes (Scollard et al., 2006; Eichelmann et al., 2013).

As deformidades relacionadas à hanseníase são o principal fator responsável pela estigmatização e discriminação sofrida pelos pacientes, que perdura até os dias atuais. Acredita-se que aproximadamente 90 % da população que entra em contato com o *M. leprae* seja resistente à infecção e não evolua para o adoecimento, mesmo vivendo em contato próximo com indivíduos doentes (Moraes et al., 2006).

1.1.1. Epidemiologia

A hanseníase é considerada uma doença negligenciada, permanecendo como um grave problema de saúde pública mundialmente, afetando na maioria dos casos indivíduos de baixo poder aquisitivo. No ano 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) implementou um programa para a eliminação da hanseníase e determinou o índice de menos de 1 caso a cada 10.000 habitantes como aceitável. Embora tenha sido observada uma queda no número de novos casos detectados, até o momento tal índice está longe de ser alcançado em países descritos como importantes focos endêmicos da doença (Nobre et al., 2017).

No ano de 2017, de acordo com a OMS, a incidência global de hanseníase foi de 210.671 casos, com taxa de 2.77 casos novos a cada 100.000 habitantes. Desses, 153.487 casos ocorreram no sudeste asiático, seguido do continente americano onde foram reportados 29.101. O Brasil ocupa um papel de destaque no cenário mundial, sendo o segundo país em número de novos casos de hanseníase, atrás somente da Índia, tendo notificado 26.875 novos casos, com taxa de detecção de 13 casos por 100.000 habitantes apenas no ano de 2017 (Figura 1.1), o que

replicação do *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), que dura aproximadamente 20 horas (Eichelmann et al., 2013).

O *M. leprae* possui forma de um bastonete, medindo de 1,5 a 8,0 µm de comprimento e em torno de 0,2 a 0,5 de largura. Sua característica de bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) se dá devido a coloração em vermelho pela fucsina que não é perdida em lavagem com álcool-ácido (Ress, 1985). A parede celular do *M. leprae* é constituída por lipídeos abundantes na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos de alto peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM). Além desses componentes, o *M. leprae* possui um glicolípido exclusivo localizado na camada mais externa da sua parede celular, o glicolípido fenólico-1 (PGL-1) (Spencer & Brennan, 2011). O PGL-1 já foi identificado nas lesões, sangue periférico e urina de pacientes infectados, possuindo assim um papel importante no diagnóstico da doença (Foss, 1997).

Embora esforços tenham sido realizados para conseguir cultivar esse microrganismo em meios artificiais, até o momento isso não foi alcançado. Este fato restringe a replicação do *M. leprae* à modelos utilizando animais. Inicialmente, em meados de 1960, Shepard observou que o coxim plantar de camundongos BALB/c infectados com *M. leprae* apresentava multiplicação lenta do bacilo e uma lesão localizada característica de hanseníase (Shepard, 1960 e 1962). A infecção de camundongos nude Foxn1nu/nu também foi demonstrada como uma fonte de obtenção de bacilos. Nesses animais, bacilos viáveis derivados do coxim plantar são obtidos em maiores quantidades, visto que eles são mais susceptíveis à infecção por *M. leprae* devido à ausência de linfócitos T (Figura 1.2). Após a inoculação de 5×10^7 bacilos é possível obter dentro de 6 meses, $1-5 \times 10^9$ bacilos viáveis derivados desses animais (Truman & Krahenbuhl, 2001, Lahiri et al., 2005).

A obtenção de *M. leprae* para usos experimentais também pode ser realizada em tatu nove bandas (*Dasypus novencinctus*), que possui crescimento disseminado do mesmo, afetando diversos órgãos como gânglios linfáticos, baço e fígado, possibilitando a sua purificação em maior quantidade de bacilos vivos ou mortos após irradiação e/ou sonicação (Truman et al., 1986; Walsh et al., 1986; Lloyd&Draper, 1986).

Recentemente, Avanzi e colaboradores identificaram a presença de esquilos vermelhos (*Sciurus vulgaris*) infectados com *M. leprae* na ilha de Brownsea ao sul da

Inglaterra. Neste trabalho, tecidos infectados provenientes de esquilos mortos foram analisados por PCR para a identificação de DNA do bacilo. Além disso foi realizado o sequenciamento do seu genoma. Surpreendentemente, por essas análises foi demonstrado que o genótipo dos bacilos encontrados nos esquilos é o mesmo que o também encontrado em humanos infectados no sul da Inglaterra durante a Idade Média. Enquanto que nos tatus, o genótipo do *M. leprae* era o mesmo que os obtidos de pacientes com hanseníase ao sul dos Estados Unidos. Sugerindo uma capacidade de transmissão do *M. leprae* entre humanos e animais (Truman et al., 2011; Avanzi et al., 2016)

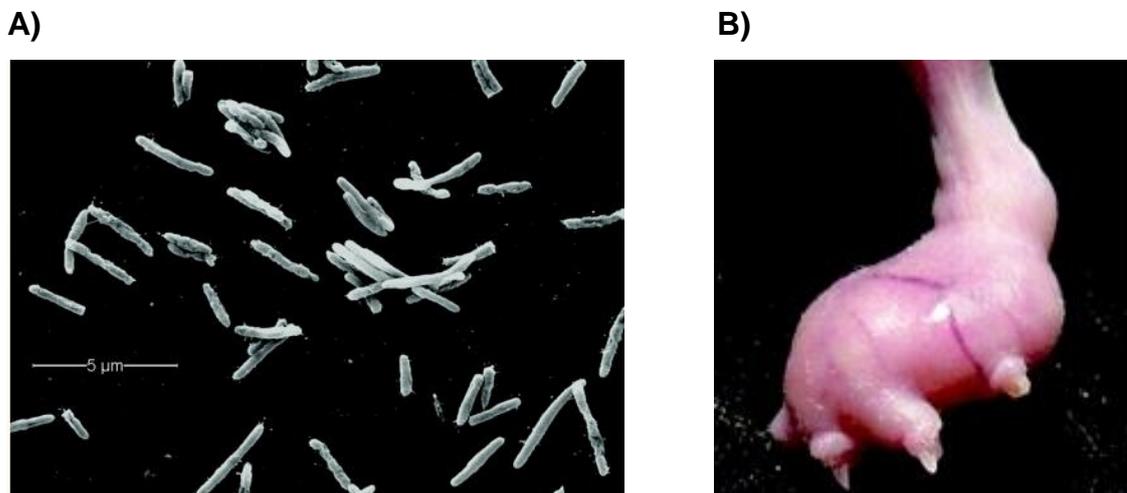


Figura 1.2. Morfologia do *M. leprae* e seu cultivo em pata de camundongo. (A) Micrografia eletrônica de varredura de suspensão contendo micobactérias obtidas pelo cultivo em pata de camundongo. (B) Coxin plantar de camundongo edemaciado após 6 meses de infecção. (Scollard et al., 2006)

No ano de 2001, o genoma do bacilo foi completamente analisado, utilizando-se lesões de pele de uma paciente multibacilar (MB). Assim, foi possível observar que em comparação ao *M. tuberculosis*, o genoma do *M. leprae* passou por uma redução evolutiva, apresentando somente cerca de 49% do seu genoma codificante, interferindo em diversas vias metabólicas essenciais para a sua replicação e explicando assim, em parte, a necessidade do metabolismo intracelular e a dificuldade do cultivo *in vitro* (Cole et al., 2001).

1.1.3. Transmissão e diagnóstico

Acredita-se que a principal fonte de transmissão relacionada ao *M. leprae* se dá pelo trato respiratório superior, com contato direto e prolongado com indivíduos MB infectados. Essa hipótese ganhou força após a publicação de trabalhos que demonstraram evidências da transmissão de bactérias viáveis presentes na mucosa das vias aéreas superiores de indivíduos infectados via aerossóis, e em contatos de pacientes MB antes do desenvolvimento clínico da doença (Fine, 1992; Suneetha et al., 1998). Em secreção nasal, um estudo mostrou que o bacilo pode sobreviver por até 7 dias em temperaturas em torno de 20°C, embora perca parte de sua viabilidade após proliferação (Ress & Yong, 1994).

O principal método de diagnóstico da doença é clínico, ou seja, são realizadas análises do histórico do paciente, sintomatologia e apresentação de sinais característicos da doença. A presença de lesões de pele, o espessamento de nervos, em especial os periféricos, além da perda de sensibilidade local são os principais sintomas descritos (MS, 2017).

Análises laboratoriais como a histopatologia de lesão obtidas por biópsias cutâneas ou dos ramos sensitivos dos nervos periféricos, identificam a presença de bacilo pela coloração de Wade (Wade, 1952). A baciloscopia retirada da linfa também pode ser realizada em conjunto, para a contagem de bacilos provenientes da linfa em lente de imersão, após coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (Cocito & Delville, 1985; MS, 2010). Ensaio imunoenzimático (ELISA) anti-PGL1, teste de Mitsuda, que avalia a presença de uma reação de hipersensibilidade tardia (celular) através de injeção intradérmica de bacilos inativados, e mais recentemente, a detecção do DNA da micobactéria por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) são realizados em centros de referência como complementação do diagnóstico clínico (Martinez et al., 2009 e 2011; Eichelmann et al., 2013; MS, 2017).

Na baciloscopia, após a contagem é determinado o índice baciloscópico (IB) de cada paciente em escala logarítmica que varia de 0 em pacientes do polo tuberculóide à 6+ em pacientes do polo lepromatoso. Já o índice logarítmico da biópsia (ILB) se difere do IB por levar em conta o logaritmo da área ocupada pelos granulomas (Ridley & Jopling, 1962; MS, 2010 e 2017)

1.1.4. Classificação clínica da hanseníase

Estima-se que cerca de 90% dos indivíduos que entram em contato com o bacilo apresentam uma resposta imunológica eficaz contra a infecção e, com isso, não desenvolvem a doença. Porém, quando a infecção é instalada, o indivíduo pode permanecer na forma clínica classificada como indeterminada, sem o envolvimento de manifestações clínicas, por um longo período. Em 1966, os patologistas Ridley e Jopling criaram um sistema de classificação de pacientes com hanseníase enfatizando aspectos histopatológicos das lesões. Tal classificação também utiliza critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos, embora seja unanimidade que o critério básico da classificação primária deva ser o clínico, abrangendo a morfologia das lesões cutâneas e as manifestações neurológicas (ILA, 1953). Essa classificação é utilizada em centros de referência e divide a doença em dois polos distintos, o polo tuberculóide e o polo lepromatoso, além de uma categoria intermediária, imunologicamente instável, chamada de dimorfa ou boderline, que leva em consideração o amplo espectro de formas clínicas em que os indivíduos infectados podem desenvolver (Ridley & Jopling, 1962; Scoolard et al., 2006).

Os pacientes do polo tuberculóide são classificados com a forma clínica Tuberculóide-Tuberculóide (TT), apresentando uma lesão de pele bem delimitada, poucos bacilos ou ausência dos mesmos, formação de granulomas bem desenvolvidos que se estendem até a epiderme, com a presença de infiltrado macrófagico e linfocítico, além de uma alta produção do fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e interferon- γ (IFN- γ) antígeno-específico, com alta produção de iNOS culminando em uma resposta imune do tipo celular efetiva contra o bacilo (Ridley & Jopling, 1962; Nath et al., 2000; Hall, 2011).

A maioria dos pacientes infectados desenvolvem as formas clínicas do polo intermediário da doença, o boderline, se dividindo de acordo com o grau de resposta frente a infecção em Boderline-Tuberculóide (BT), Boderline-Boderline (BB) e Boderline-Lepromatosa (BL). A forma clínica BT, embora clinicamente se assemelhe a forma TT, possui lesões menores e mais frequentes, com bordas menos definidas. Além disso, embora haja mais nervos afetados, o espessamento não acontece tão grosseiramente. Nos pacientes BB é observado um estado intermediário entre a quantidade e tamanho das lesões. Geralmente, apresentam placas eritematosas

irregulares com uma mancha hipopigmentada em formato oval no centro da lesão, além de alteração de sensibilidade moderada. Por último, os pacientes BL podem desenvolver pápulas, placas e nódulos e, embora tenham lesões em maior quantidade, não são totalmente anestésicas. O espessamento dos nervos ocorre no momento do aparecimento das lesões, diferente do que acontece no polo lepromatoso, além da falta de características importantes do polo lepromatoso como queratite e ulceração.

No polo lepromatoso, o outro extremo da hanseníase, a forma clínica Lepromatosa-Lepromatosa (LL) é caracterizada pela presença de múltiplas lesões mal delimitadas, distribuídas por todo o corpo, alta carga bacilar, e inúmeros macrófagos espumosos ricos em bacilos, sem formação de granulomas (Ridley & Jopling, 1966). A presença de macrófagos espumosos ricos em bacilos é uma característica histológica dessa forma clínica. Nas lesões mais antigas, são observados vacúolos nas células. O aspecto espumoso dos macrófagos presentes nas lesões de pacientes LL foi relacionado ao acúmulo de corpos lipídicos induzidos pelo *M. leprae* (Pinheiro et al., 2011). Além disso, há o desenvolvimento de placas e nódulos e é comum observar a presença de edema, espessamento da pele do rosto, acometimento do nervo óptico, podendo levar a cegueira, ulceração, queratite e alterações ósseas nas mãos e pés. As primeiras manifestações clínicas são relacionadas às lesões de pele, sem o acometimento sintomático dos nervos, que pode aparecer conforme o decorrer da infecção devido a degeneração neural, levando a perda de sensibilidade e enfraquecimento muscular. Essa é a principal forma clínica relacionada à incapacidades graves nos indivíduos infectados (Ridley & Jopling, 1960).

Sabe-se que o tipo de resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro determina a forma clínica que irá se desenvolver. O padrão de citocinas produzidas nas lesões e a presença de determinados tipos celulares caracterizam as formas clínicas. Na forma tuberculoide estão presentes nas lesões IFN- γ , citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas 2 (IL-2), IL-12, e o fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), o que favorece o desenvolvimento de atividades microbicidas nos macrófagos (Aarão et al., 2014; Abdallah et al., 2014; Fallows et al., 2016). Macrófagos M2 (supressores) estão presentes nas lesões LL, acompanhado de um padrão de citocinas Th2, com alta produção de IL-4, IL-10 e

TGF- β , que induzem uma resposta inefetiva contra a infecção devido a característica intracelular do patógeno (Oliveira Fulco et al., 2014; de Souza et al., 2016; Fallows et al., 2016) (Figura 1.3).

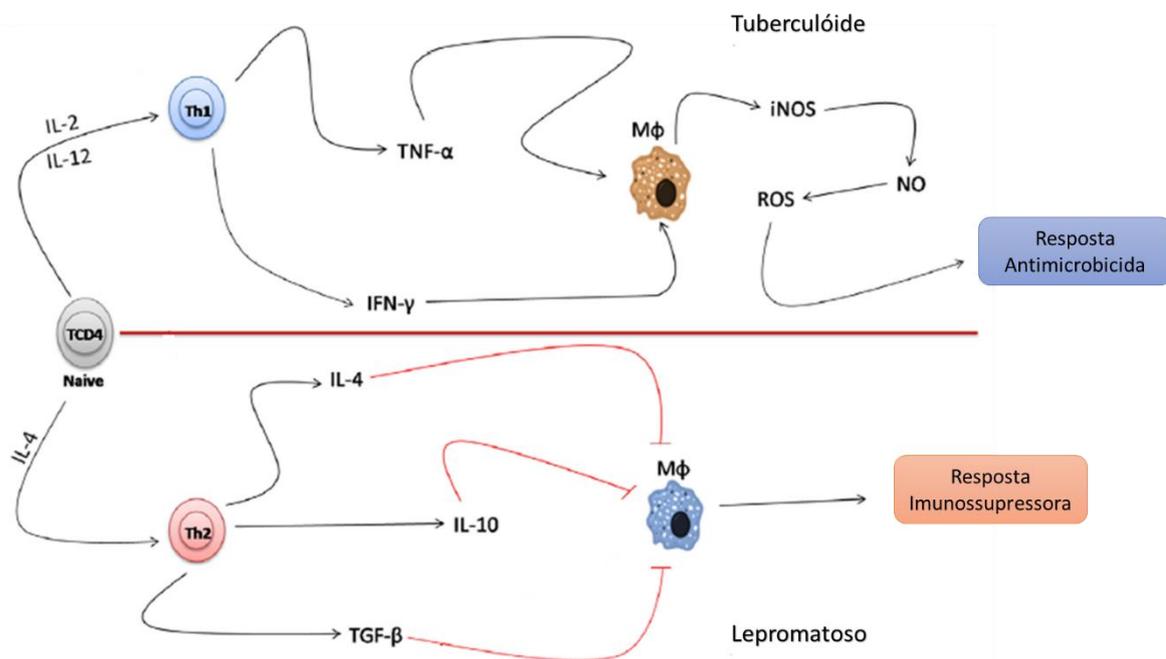


Figura 1.3. Resposta imunológica da hanseníase de acordo com os polos. No polo tuberculóide há a presença de TNF- α e INF- γ citocinas do tipo Th1, levando ao desenvolvimento de uma resposta antimicrobica em macrófagos. Em contrapartida, no polo lepromatoso a presença dos mediadores relacionados a resposta Th2, IL-4, IL-10 e TGF- β culminam no desenvolvimento de uma resposta imunossupressora, favorecendo à persistência da infecção (Fonte: Adaptado de de Souza et al., 2017).

Em 1982, a OMS criou uma classificação simplificada para fins de tratamento da hanseníase, baseada na extensão da doença. Essa “Classificação Operacional” divide os pacientes em dois grandes grupos: multibacilares (MB) e paucibacilares (PB). Quando proposta inicialmente, a classificação levava em conta o índice baciloscópico (IB), dividindo os casos em PB quando o IB fosse menor que 2 e em MB quando o IB fosse maior ou igual a 2 (WHO, 1982). Posteriormente, levando em consideração a dificuldade para a realização da baciloscopia em alguns lugares, a OMS passou a recomendar a classificação com base apenas em critérios clínicos, dividindo os pacientes em PB quando apresentam até cinco lesões cutâneas e em MB quando apresentam seis ou mais lesões (WHO, 1998). Geralmente, os pacientes PB possuem as formas TT e BT, enquanto os MB são pacientes BB, BL e LL.

1.1.5. Reações hansênicas

Alguns pacientes com hanseníase podem desenvolver os chamados episódios reacionais ou reações hansênicas. As reações são caracterizadas por manifestações clínicas resultantes de uma resposta inflamatória aguda em resposta ao bacilo, afetando principalmente a pele e nervos, sendo a principal causa de morbidade e incapacidade funcionais dos nervos periféricos (Kamath et al., 2014). A produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, em especial TNF, IL-1 β e IL-6, podem interferir na resposta imune levando assim ao surgimento de lesões graves, reativação de lesões antigas e do mal estar sistêmico, relacionados aos episódios reacionais (Sarno & Sampaio, 1996). Os episódios reacionais podem ser desenvolvidos a qualquer momento durante a poliquimioterapia (PQT). São descritos dois tipos de reações, a reação reversa (RR) ou reação tipo 1, que ocorre principalmente nos pacientes com as formas BT, BB e BL, e o eritema nodoso hansênico (ENH) ou reação tipo 2, que acomete os pacientes BL ou LL (Kamath et al. 2014).

A RR se caracteriza por uma inflamação aguda desencadeada por um desenvolvimento súbito de imunidade celular e geralmente surge durante o tratamento ou após o primeiro ano de alta (Foss, 2003; Gallo et al., 2005; Nery et al., 2006). Variações nos níveis hormonais e co-infecções são tidos como fatores de risco para o desenvolvimento da RR (Andrade et al., 2015).

A RR é descrita como uma reação de hipersensibilidade tardia, na qual os pacientes desenvolvem uma resposta imune celular exacerbada com aumento no influxo de linfócitos T para os locais de lesão e aumento na expressão de TNF, TGF- β , iNOS, IL-6 e IL-1 β nas lesões em resposta aos antígenos do *M. leprae* (Andrade et al., 2015). Clinicamente é observado o surgimento de novas lesões de pele, edemas nas mãos, pés e face característicos dessa reação. A RR é a principal causa de comprometimento neural acentuado e grave, podendo levar à neuropatia periférica sensorial e motora (Lockwood et al., 1993; Kamath et al., 2014). Além disso, evidências na literatura apontam que há uma diminuição dos níveis das citocinas IL-4, IL-5 e IL-10, corroborando com a hipótese de aumento de resposta imune celular (Yamamura et al., 1991 e 1992).

O ENH é uma reação que acomete cerca de 50% dos pacientes LL e entre 1 e 30% dos pacientes BL, sendo na maioria das vezes recorrente. O ENH é

caracterizado clinicamente por lesões cutâneas eritematosas e nódulos subcutâneos doloridos que podem evoluir para ulceração. Diferentemente da RR, o quadro de ENH geralmente é acompanhado de sintomas sistêmicos como febre, mal-estar e inchaço dos gânglios linfáticos. A neurite pode acometer os pacientes com ENH, embora mais branda do que no quadro de RR (Kahawita & Lockwood, 2008).

1.1.6. Tratamento

Em 1981, a PQT foi proposta por especialistas, e permanece atualmente como a estratégia terapêutica preconizada pela OMS envolvendo a combinação de três fármacos. A PQT auxilia no bloqueio da cadeia da transmissão, pois atua matando o bacilo logo após o início do tratamento, tornando-se importante no controle epidemiológico da doença. Para pacientes classificados como multibacilares o tratamento dura um ano e são utilizados os seguintes medicamentos, rifampicina (600 mg, uma dose mensal), clofazimina (300 mg, uma dose mensal e 50 mg/dia) e dapsona (100 mg/dia), levando a um total de 12 doses ao fim do tratamento. Em relação aos pacientes paucibacilares, o tratamento dura 6 meses, e é realizado com a administração de rifampicina (600 mg, uma dose mensal) e dapsona (100 mg/dia), totalizando 6 doses (Gallo et al., 2005). A rifampicina é a droga que atua melhor na PQT, sendo capaz de eliminar em uma única dose cerca de 99,9 % do *M. leprae* presente (Hastings, 1998; WHO, 2012).

O tratamento dos pacientes hansênicos que apresentam as reações é diferente do realizado nos sem reação. No caso de pacientes acometidos pela RR o tratamento é baseado na administração do corticóide prednisona com o objetivo de reduzir a reação inflamatória na dose de 1 a 2 mg/Kg (peso/dia) com redução gradual da dose até melhora do quadro (MS, 2010).

No caso de pacientes apresentando ENH a droga de escolha é a talidomida na dosagem de 100 à 300 mg/dia à depender da gravidade do quadro. A talidomida é um derivado do *ácido glutâmico* e sua estrutura é formada por dois anéis amida e um centro quiral. Dependendo do estado do carbono quiral, a talidomida apresenta dois estados enantioméricos que se interconvertem rapidamente formando concentrações similares de cada forma no organismo. O enantiômero R(+) é relacionado aos efeitos sedativos da droga, enquanto o enantiômero S(-) é

relacionado aos efeitos teratogênicos (Vargesson, 2015). Devido ao seu efeito teratogênico, a administração de talidomina não é recomendada em mulheres em idade fértil e/ou grávidas. Além disso, em alguns países o uso da talidomida é proibido ou restrito a grupos específicos (Walker et al., 2007; Walker., 2015). Nesses grupos prescreve-se prednisona na dose de 1 a 2 mg/kg/dia (MS, 2010), ou outras drogas como a clofazimina, pentoxifilina e azatioprina (Azulay, 2011). O principal efeito da talidomida no ENH se dá pela redução da produção de TNF, além da inibição do recrutamento de neutrófilos pela expressão reduzida de moléculas de adesão nas células endoteliais diminuindo o processo inflamatório (Sampaio et al., 1991; Lee et al., 2010).

Recentemente, imunobiológicos anti-TNF tem sido usados como alternativas de tratamento em casos de ENH resistentes aos tratamentos convencionais recomendados. O Infliximab – anticorpo inibidor de TNF foi usado em um paciente com ENH resistente a prednisona, pentoxifilina e talidomida e após 24 horas, foi possível observar regressão dos sintomas. O paciente não apresentou nenhum episódio de ENH durante o ano de acompanhamento pós tratamento (Faber et al., 2006). O Eterncept também foi utilizado em conjunto com corticosteróides em pacientes apresentando quadro de ENH resistente e recorrente. Esse imunobiológico age como uma proteína análoga ao receptor de TNF, se ligando ao TNF solúvel inibindo sua ação (Ramien et al., 2011; Chowdhry et al., 2016; Santos et al., 2017).

1.2 Eritema Nodoso Hansênico

É descrito que pacientes apresentando a forma clínica LL, infecções bacterianas ou virais, vacinação, gravidez e estresse psicológico são considerados fatores de risco significativos no desenvolvimento de ENH (Nery et al., 1998; Manandhar et al., 1999).

Durante muito tempo a presença de imunocomplexos foi tida como o principal mecanismo relacionado ao dano tecidual e a patogenia do ENH. Por meio de microscopia de fluorescência foi descrito que a alta produção de anticorpos específicos em conjunto com fragmentos de bacilos leva a deposição granular de imunoglobulinas e proteínas do complemento nas lesões de pacientes ENH, próximo

aos vasos e ao endotélio em áreas onde há a presença de infiltrado neutrofílico (Wemambu et al., 1969; Murphy et al., 1986). Análises de soro de pacientes com hanseníase provenientes de área endêmica mostraram um aumento na presença de imunocomplexos circulantes quando comparados à pacientes de áreas não endêmicas. Embora não tenha tido diferença entre os níveis de imunocomplexos entre pacientes com hanseníase sem e com ENH, o componente da via do complemento C3d se mostrou aumentado em pacientes ENH, indicando o envolvimento de proteínas do sistema complemento no ENH (Valentijn et al., 1982).

Entretanto, evidências passaram a indicar a importância da imunidade celular no desenvolvimento e evolução do ENH. Foi observada uma maior ativação de macrófagos e linfócitos T no quadro de ENH, assim como o aumento nos níveis séricos de TNF (Sarno et al., 1991). Além disso, foi descrito um aumento da expressão dos genes relacionados à TNF e IL-12 em linfócitos T e macrófagos presentes nas lesões de pacientes com ENH (Moraes et al., 1999). Em adição, observou-se um aumento na expressão do receptor semelhante a *Toll* 9 (TLR-9) e produção de diversas citocinas e mediadores pró-inflamatórios, como TNF, IL-6 e IL-1 β , na fração de células mononucleares de pacientes com ENH (Dias et al., 2016).

Uma característica histológica importante observada somente no quadro de ENH é a presença de infiltrado inflamatório de neutrófilos nas camadas profundas da derme e tecido subcutâneo (Figura 1.4), associado à vasculite e uma leucocitose neutrofílica sistêmica (Mabalay et al., 1965; Anthony et al., 1983). Nos anos 90, um estudo do nosso grupo observou que neutrófilos de pacientes LL e com ENH produzem níveis elevados de IL-8 e TNF- α após estímulo *in vitro* com *M. leprae*, sugerindo que os neutrófilos possuem um papel importante na resposta inflamatória dos pacientes com ENH (Oliveira et al., 1999).

Atualmente, o ENH tem sido considerado como uma condição imunomediada por neutrófilos e alguns trabalhos indicam o papel ativo de neutrófilos nesse quadro clínico (Polycarpou et al., 2017). Análises de bioinformática de microarranjos realizado em lesões de pele de pacientes LL com e sem ENH revelou a expressão majoritária de genes relacionados ao recrutamento de neutrófilos em pacientes ENH (Lee et al. 2010).

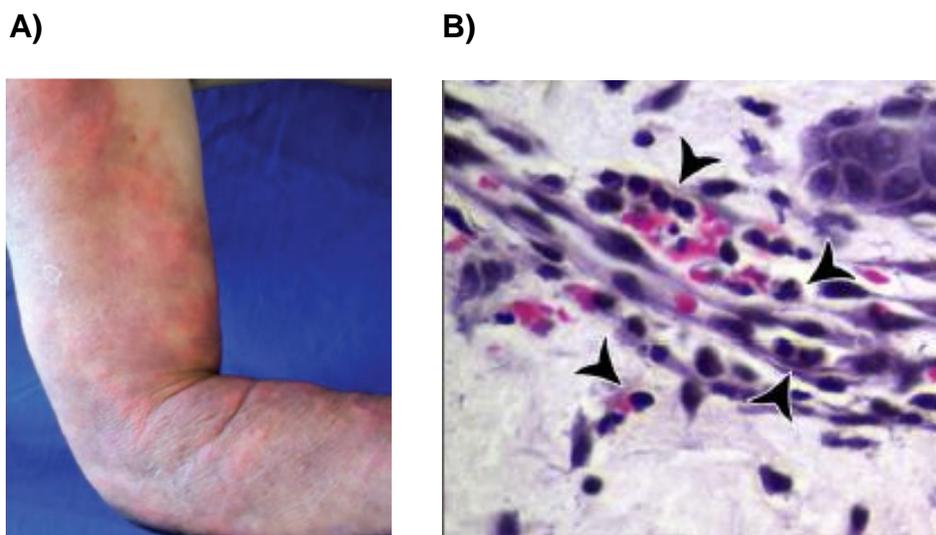


Figura 1.4. Eritema Nodoso Hansênico. (A) Imagem representativa de um paciente com ENH. (B) Amostra de biópsia de pele de paciente com ENH onde é possível observar infiltrado neutrofílico. As setas indicam os neutrófilos no tecido. Imagem corada com H&E (Fonte: Adaptado de Mendes et al., 2017, e Schmitz et al., 2016).

O nosso grupo mostrou que o receptor de alta afinidade para IgG1 e IgG3, o CD64, se encontra aumentado em neutrófilos de pacientes com ENH, e tal aumento está associado com a gravidade do ENH (Schmitz et al., 2016). O aumento de CD64 em neutrófilos é observado em infecções bacterianas, como na sepse, onde está relacionado com o prognóstico e gravidade da coagulação intravascular disseminada, além de aumentar a capacidade de adesão de neutrófilos ao endotélio (Herra et al., 1996; Fadlon et al., 1998; Song et al., 2008). Além disso, foi observado um aumento nos níveis plasmáticos de pentraxina 3 (PTX3), uma proteína constitutiva presente exclusivamente nos grânulos de neutrófilos (Jaillon et al., 2007), em pacientes multibacilares com e sem ENH. De fato, demonstramos a colocalização de PTX3 e MPO, sugerindo que os neutrófilos possuem um papel central na liberação desse mediador imunológico nas lesões, assim como na patogenia do ENH. Interessantemente, pacientes multibacilares que apresentavam níveis séricos aumentados de PTX3 no momento do diagnóstico evoluíram para um quadro ENH, sugerindo que esta molécula tem potencial como biomarcador preditivo de ENH (Mendes et al. 2017).

Recentemente, demonstramos a presença de neutrófilos em estado de NETose, um tipo de morte celular. As redes neutrofílicas extracelulares (NETs, *neutrophil extracellular traps*) estariam presentes em lesões de pacientes ENH, e

neutrófilos de pacientes desse mesmo grupo apresentaram taxa de NETose espontânea aumentada. Além disso, o lisado de *M. leprae* foi capaz de induzir NETose em neutrófilos de doadores saudáveis, e de pacientes MB com e sem ENH *in vitro*. Estes dados sugerem que as NETs podem estar diretamente relacionadas com o processo inflamatório nesses pacientes (Silva, 2018).

1.3 Neutrófilos

1.3.1. Geração e liberação na corrente sanguínea

Os neutrófilos, são os leucócitos circulantes mais abundantes nos seres humanos, representando cerca de 50-70%. A sua produção diária atinge mais de 10^{11} células em indivíduos saudáveis, podendo ser maior em situações de infecção, e acontece na medula óssea a partir de um precursor mielóide. A produção de neutrófilos é controlada principalmente pelo fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF), produzido em resposta a interleucina-17A (IL-17A) sintetizada por células T reguladoras (Kolaczowska & Kubes, 2013). Na presença de neutrófilos apoptóticos, os mesmos podem ser eliminados por macrófagos teciduais. Assim, esses macrófagos diminuem sua produção da citocina inflamatória IL-23, que atua reduzindo o estímulo para a produção e liberação de IL-17 pelas células T. Quando há estímulo com produtos bacterianos, como a endotoxina por exemplo, e produção em quantidades elevadas de IL-1, fator de necrose tumoral (TNF) e fatores de crescimento G-CSF e GM-CSF, a liberação de neutrófilos na circulação é aumentada (Nauseef & Borregaard, 2014).

Durante a maturação, os neutrófilos passam por diversos estágios onde são chamados de mieloblastos, promielócitos, mielócitos e metamielócitos, até atingirem as formas classicamente encontradas na circulação. Na forma imatura circulante, os neutrófilos possuem núcleo em forma de bastão, originando assim a nomenclatura de bastonetes, enquanto as formas morfolologicamente maduras, que representam a maioria dos neutrófilos circulantes, possuem núcleo segmentado entre três à cinco lóbulos. Em situações específicas, é possível observar a presença de neutrófilos

hipersegmentados, com núcleo apresentando 6 ou mais lobulações (Kolaczowska & Kubes, 2013; Mayadas et al., 2014) (Figura 1.5).

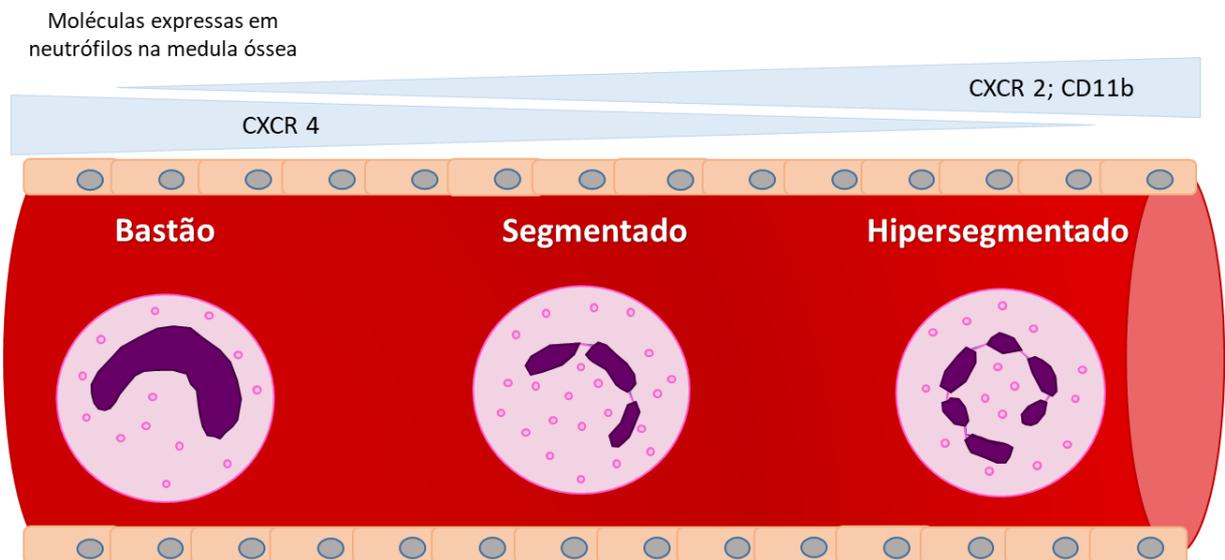


Figura 1.5. Formas de neutrófilos encontrados na circulação. Neutrófilos imaturos possuem o núcleo em formato de bastão e aumento na expressão de CXCR4 na superfície favorecendo a sua retenção na medula. Em condições inflamatórias os mesmos são liberados na circulação. Ao final do processo de maturação, há um aumento na expressão de CXCR2 e CD11b na superfície da célula, aumentando a interação da célula com ligantes presentes nas células endoteliais. Assim, as formas maduras são liberadas na circulação. Os neutrófilos maduros predominantemente encontrados são caracterizados pelo núcleo segmentado. Em algumas condições também são encontrados neutrófilos hipersegmentados (fonte própria).

A retenção de neutrófilos imaturos na medula óssea e a liberação de formas maduras para a circulação estão estritamente relacionadas a um mecanismo de feedback envolvendo selectinas, receptores de quimiocinas e integrinas. Resumidamente, células estromais da medula óssea -fibroblastos, macrófagos, células endoteliais e adipócitos - expressam CXCL12, um ligante para o receptor CXCR4 presente nas formas jovens de neutrófilos, mantendo assim essas formas na medula óssea. Durante o curso da granulopoiese, as formas maduras de neutrófilos diminuem sua expressão de CXCR4 e passam a expressar CXCR2, um receptor para CXCL8 (IL-8) presente nas células endoteliais, além de se tornarem CD62L^{hi}, favorecendo a interação com as células endoteliais e a mobilização desses neutrófilos para a circulação. Interessantemente, com o passar do tempo, neutrófilos circulantes se tornam senescentes, culminando na expressão reduzida de L-

selectina (CD62L), além do aumento de CXCR4 e CD11b, favorecendo o retorno para a medula óssea onde entram em apoptose e são fagocitados por macrófagos locais. Esse processo de maturação, liberação na circulação e retorno para a medula óssea ocorre em um período médio de 24 horas (Elghetany et al., 2002; Nauseef & Borregaard, 2014; Rosales, 2018).

Devido ao citoplasma rico em vesículas secretórias e grânulos que são gerados sequencialmente acompanhando o processo de maturação, os neutrófilos são classificados como granulócitos. Tradicionalmente, os grânulos dos neutrófilos eram subdivididos em peroxidase positivo e peroxidase negativo, levando em consideração a presença de mieloperoxidase (MPO). Porém, devido a grande heterogeneidade dos grânulos, os mesmos foram subdivididos em três grupos distintos. Entre outras moléculas, os grânulos primários ou azurofílicos, são ricos em MPO e elastase neutrofílica; os grânulos secundários ou específicos, contêm grande quantidade de lactoferrina, além de pentraxina-3 (PTX-3); e os terciários, contêm gelatinases, sendo a mais importante a metaloproteinase de matrix 9 (MMP9) (Cowland & Borregaard, 2016).

Durante muito tempo, os neutrófilos foram considerados células com tempo de meia vida curta, durando em média 1,5 e 8 horas na circulação de camundongos e humanos, respectivamente. No tecido o tempo varia em torno de 1-2 dias. Entretanto, em 2010 um estudo demonstrou que neutrófilos humanos podem sobreviver por um período que varia entre 12,5 horas e 5,4 dias na circulação quando em situações homeostáticas (Pillay et al., 2010). No entanto, em um ambiente inflamatório, a produção de citocinas, quimiocinas, entre outros compostos, induzem uma maior ativação dos neutrófilos, e essa ativação celular pode culminar no aumento da sobrevivência (Scappini & Cassatela, 2014).

1.3.2. Mecanismos de ação direta contra patógenos

Os neutrófilos são descritos como o principal tipo celular relacionado à inflamação aguda, podendo atuar contra patógenos invasores diretamente por meio de alguns mecanismos:

Fagocitose: neutrófilos são considerados fagócitos profissionais. Após a opsonização de microrganismos pela ligação de anticorpos e sistema complemento, os neutrófilos os engolfam mediante interação com lipídeos presentes na membrana, alterações conformacionais no citoesqueleto e ativação de vias de sinalização celular. O englobamento de partículas ou microrganismos inteiros, leva à formação de fagossomas, seguido da liberação de proteínas dos grânulos em seu interior. Em seguida, há a produção de compostos tóxicos como a nicotinamida adenina fosfato dinucleotídeo oxidase (NADPH), e as espécies reativas de oxigênio (ROS). O aumento desses compostos favorece o aumento do fluxo de íons para o interior do fagossoma, levando a alterações no metabolismo do patógeno e, por consequência, a sua destruição (Nauseef & Borregaard, 2014; Kruger et al., 2015) (Figura 1.6).

Degranulação: o conteúdo dos grânulos de neutrófilos é formado por potentes proteínas antimicrobianas e enzimas proteolíticas. A liberação desses produtos é uma importante fonte na qual os neutrófilos atuam contra patógenos invasores. A propensão de liberação dos grânulos é inversamente proporcional à ordem de geração dos mesmos. Sendo assim, primeiramente é liberado o conteúdo das vesículas secretórias, seguido dos grânulos terciários, secundários, e por último dos grânulos primários (Cowland & Borregaard, 2016). A exocitose é regulada por sinais binários dependentes de adesão e ligação através de receptores imunes. Inicialmente, com o remodelamento de actina e polarização dos microtúbulos ocorre a translocação dos grânulos para a membrana celular. Em seguida, as proteínas Rab e SNARE se fundem mediando a adesão dos grânulos na membrana. Com isso, há um aumento do fluxo de cálcio para o interior da célula favorecendo a exocitose do conteúdo dos grânulos (Sheshachalam et al., 2014).

NETs (neutrophil extracellular traps): Em 2004, foi descoberto um mais um mecanismo de atividade microbicida de neutrófilos, através da liberação de NETs. As NETs são caracterizadas por uma rede de fibras compostas pelo DNA que aprisiona e mata microrganismos extracelulares, além de contribuir para o processo inflamatório pela liberação de compostos antimicrobianos (Brinkmann et al., 2004). As NETs são formadas por redes de cromatina em conjunto com uma variedade de proteínas granulares e citosólicas derivadas de neutrófilos (Papayannopoulos et al.,

2010). A NETose foi caracterizada como um novo tipo de morte celular programada. Diferentemente do que é visto na apoptose e na necrose, durante a NETose a cromatina se descondensa e, ocorre a desintegração da membrana nuclear e plasmática, possibilitando a liberação das NETs para posterior imobilização e eliminação de microrganismos invasores (Mayadas et al., 2014; Skendros et al., 2015).

Trogocitose: Recentemente, foi descrito um novo mecanismo no qual neutrófilos podem atuar contra patógenos, a trogocitose. Ela é caracterizada pela capacidade de algumas células retirarem fragmentos de células vizinhas ou de patógenos. A trogocitose foi descrita em outras células imunes como um mecanismo de transferência de proteínas de membrana, até por bactérias intracelulares na infecção de células vizinhas (Dhainaut & Moser, 2014; Steele et al., 2016). Porém, um estudo recente demonstrou que os neutrófilos utilizam desse mecanismo para a degradação de *Trichomonas vaginalis* (Mercer et al., 2017), evidenciando assim, a capacidade dos neutrófilos na proteção do hospedeiro por meio de fontes alternativas.

Produção de moléculas pró-inflamatórias: A produção de citocinas, quimiocinas e mediadores lipídicos é um mecanismo usado por neutrófilos na inflamação após ativação por estímulos como agentes microbianos, TLRs ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (Sadik et al., 2011). Neutrófilos cultivados com *M. tuberculosis*, por exemplo, liberam CXCL1 e CXCL8, duas quimiocinas envolvidas no recrutamento de neutrófilos (Riedel & Kaufmann, 1997). A produção de TNF e IL-8 por neutrófilos *in vitro* também foi observada após estímulo com *M. leprae* (Oliveira et al., 1999). Diversos trabalhos demonstraram a capacidade dos neutrófilos de produzir outros mediadores como IL-1 β , IL6, IL12, CCL2, CCL3, CCL5, CXCL2, CXCL3 (Scapini et al., 2001; Tsuda et al., 2004; Naegelen et al., 2015; Tecchio & Cassatella, 2016), além de compostos oxidativos como o complexo NADPH oxidase, que constitui a principal fonte de ROS (Decoursey & Ligeti, 2005; Winterbourn et al., 2016).

Embora muitos ainda reconheçam os neutrófilos como células simplesmente com papel de atuação direta contra microrganismos, não há dúvidas de que eles podem desempenhar funções diversificadas de acordo com o microambiente em que

se encontram, sendo capazes de alterar suas moléculas de superfície e diversificar a produção de citocinas. Essas observações reforçam a ideia de populações heterogêneas de neutrófilos (Tecchio et al., 2014; Tecchio & Cassatella, 2016).

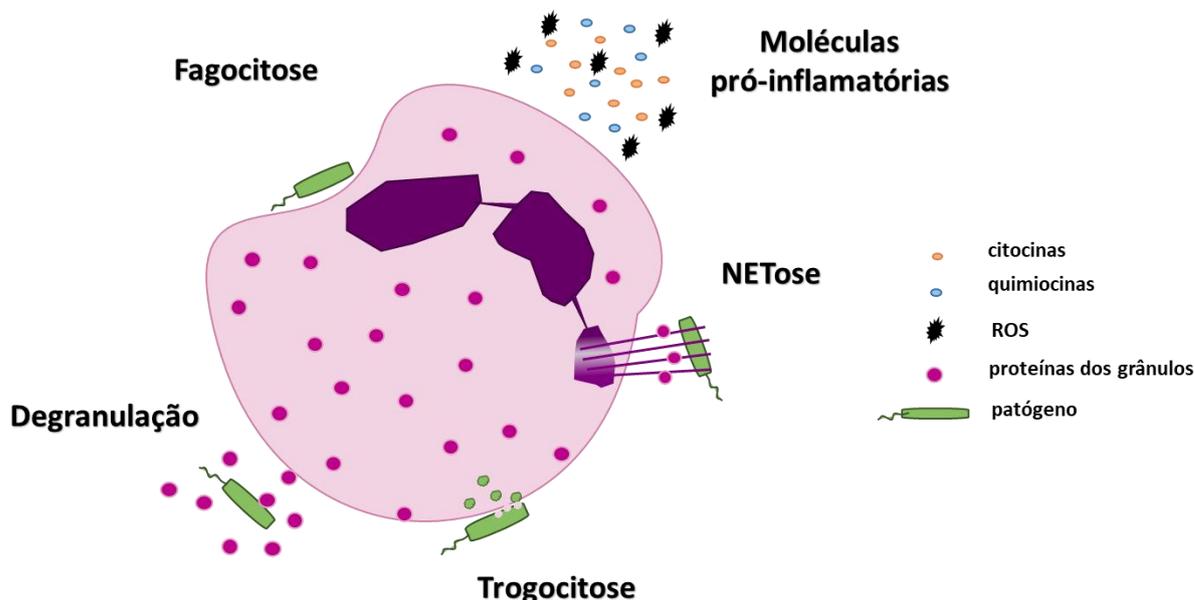


Figura 1.6. Mecanismos usados por neutrófilos para a eliminação de microrganismos. Na fagocitose, microrganismos são encapsulados pela célula e dentro de fagossomas são mortos via ação de compostos tóxicos. Na degranulação ocorre a liberação do conteúdo dos grânulos citoplasmáticos de neutrófilos, formados por diversas proteínas com propriedades antimicrobianas. No mecanismo de NETose, a membrana nuclear é desintegrada e ocorre a liberação do DNA da célula em conjunto com proteínas dos grânulos formando redes que capturam os microrganismos facilitando a sua eliminação. Na trogocitose, a célula possui a capacidade de retirar fragmentos de patógenos favorecendo sua morte. Além disso, os neutrófilos também liberam citocinas, quimiocinas e ROS em condições inflamatórias (Fonte própria).

1.3.3. Subpopulações

Embora o conceito de heterogeneidade de neutrófilos tenha sido sugerido nos anos 80 (Gallin, 1984), somente a partir do início dos anos 2000 a identificação e caracterização de subpopulações distintas de neutrófilos passou a estar no foco de diversos estudos relacionados à patogênica de inflamações sistêmicas, doenças autoimunes e câncer (Figura 1.7). Em 2004, foi publicado um dos primeiros trabalhos caracterizando subpopulações de neutrófilos. Nesse estudo, os chamados

PMN-1 e PMN-2 foram identificadas em um modelo murino de infecção com *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina. Nos camundongos que desenvolveram síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) moderada (modelo resistente), observou-se a presença dos neutrófilos classificados como PMN-1. Essa população foi associada a resposta pró-inflamatória, produzindo IL-12 e CCL3, com expressão aumentada de CD49d, assim como TLR5/TLR8 e, além disso, eram capazes de ativar classicamente macrófagos. Em contrapartida, nos camundongos que desenvolveram SIRS grave (modelo susceptível), foi observada a subpopulação PMN-2, com perfil anti-inflamatório pela produção de IL-10 e CCL2, expressando TLR7/TLR9, com capacidade de ativar alternativamente macrófagos, além de expressar níveis reduzidos de CD49d (Tsuda et al., 2004). Neutrófilos fenotipicamente similares aos PMN-1 e PMN-2 também foram descritos em infecções por *Candida albicans* e *Trypanosoma cruzi* (Mencacci et al., 2002; Tosello et al., 2012).

Uma outra subpopulação responsável por induzir angiogênese foi identificada em camundongos e em humanos. Utilizando um modelo murino de tecido não vascularizado, foi observada a presença de uma subpopulação de neutrófilos com capacidade aumentada de migração para os locais de hipóxia, além de liberação de proteases, favorecendo respostas pró-angiogênicas (Massena et al., 2015). Além disso, essa mesma população foi relacionada a revascularização de ilhotas pancreáticas transplantadas em camundongos (Jablonska et al., 2010).

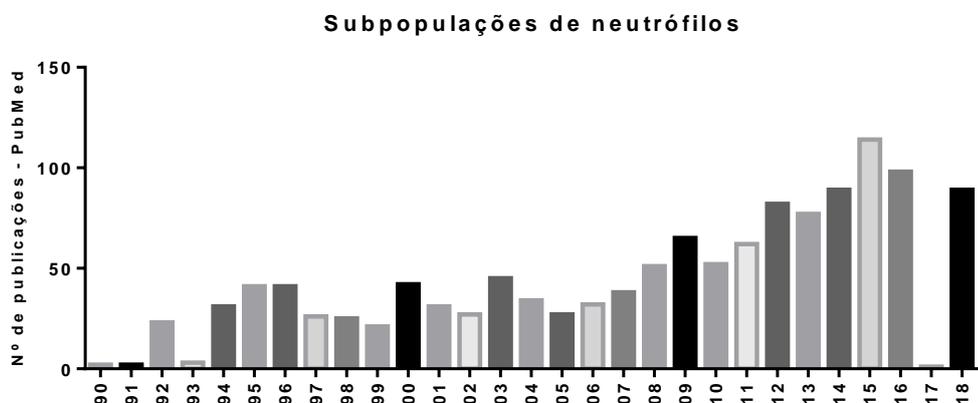


Figura1.7. Aumento no número de publicações sobre subpopulações de neutrófilos entre 1990 e 2018 no PubMed.

G-MDSCs - Em pacientes com câncer, o papel dos neutrófilos é controverso, visto que eles são capazes de desempenhar funções diferenciadas à depender de fatores liberados em resposta ao ambiente tumoral. As células supressoras derivadas de linhagem mielóide granulocítica (G-MDSC) são uma das principais subpopulações de neutrófilos relacionadas ao câncer. Inicialmente, essa população foi descrita como células supressoras mielóides (MDSC) (Peranzoni et al., 2010). Porém, com o avanço dos estudos, observou-se que havia a presença de um grupo heterogêneo de células podendo ser de origem granulocítica (G-MDSC) ou de origem monocítica (Mo-MDSC) (Raberet et al., 2014). Embora a classificação G-MDSCs possa sugerir a presença de todas as células de origem granulocítica, até o momento a presença de precursores de eosinófilos e basófilos não foi descrito (Luckner-Minden et al., 2010; Dumitru et al., 2012).

As G-MDSCs foram primeiramente classificadas como células com morfologia imatura, geralmente com núcleo em formato de bastão (Pillay et al., 2013). Essa população é observada na fração de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) e a sua principal forma de atuação se dá através da supressão de função de células T, em especial por mecanismos associados ao aumento de produção e atividade de arginase, além de síntese de compostos oxidativos como iNOS e ROS (Zea et al., 2005; Rodrigues et al., 2009; Condamine et al., 2016; Zhang et al., 2017). Diversos trabalhos mostraram que essa subpopulação atua favorecendo a progressão tumoral (Nagaraj et al., 2010; Raber et al., 2014; Keskinov & Shurin, 2015).

O perfil de expressão dos marcadores CD14⁻, CD15⁺, CD66b⁺, CD11b⁺ e CD16⁺, é usado como um método de identificação das G-MDSCs, e embora essa população também expresse outros marcadores como CD11c, CD35 e CD62L, a identificação por perfil fenotípico não é específica, já que neutrófilos maduros também compartilham esses marcadores, restringindo assim a classificação através da produção de compostos imunossupressores (Pillay et al., 2013).

N1 X N2 - Assim como a classificação de macrófagos M1 e M2, foram descritos em modelos de câncer, os chamados Neutrófilos Associados a Tumores (TANs). O primeiro trabalho descrevendo essas populações foi realizado em um modelo murino de câncer mesotelioma subcutâneo. Nesse estudo, neutrófilos com perfil antitumoral

/ pró-inflamatório, possuindo núcleo hipersegmentado, com capacidade de ativar linfócitos T citotóxicos e produzir citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias como TNF- α , foram nomeados N1. Em contrapartida, formas imaturas de neutrófilos com características pró-tumorais e imunossupressoras, especialmente por apresentarem a produção elevada de arginase, culminando assim na inativação de células T efectoras, assim como as G-MDSCs, foram nomeados N2 (Fridlender et al., 2009). Além disso, esse estudo sugeriu que o TGF- β pode exercer um papel fundamental na polarização de neutrófilos N1 em N2. Eles observaram que após tratamento com inibidor de TGF- β , houve um aumento na migração de neutrófilos N1 para o local do tumor, com elevados níveis de produção de iNOS, citocinas pró-inflamatórias e expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 nos neutrófilos. Os níveis de mRNA de TNF, ICAM-1, além de quimiocinas necessárias para o recrutamento de neutrófilos se encontraram aumentados após bloqueio de TGF- β . Entretanto, os níveis de mRNA de VEGF foram reduzidos quando comparados aos neutrófilos de camundongos não tratados com o inibidor.

Embora muito ainda tenha de ser estudado para um melhor entendimento da capacidade de polarização dos neutrófilos, um estudo recente mostrou por análise transcriptômica que os neutrófilos N1 e N2 possuem perfis de expressão gênica distintos e, que suas propriedades funcionais são possivelmente induzidas pelo microambiente tumoral no qual se encontram (Shaul et al., 2016).

1.3.3.1 Neutrófilos de baixa densidade

Tradicionalmente, os neutrófilos são purificados por meio de separação em um gradiente de densidade, como o Ficoll (Boyum, 1968), e com isso podemos observar na fração de granulócitos os chamados neutrófilos de alta densidade, ou HDNs (do inglês, “High Density Neutrophils”). Os HDNs são neutrófilos presentes em condições homeostáticas, e consistem de uma subpopulação homogênea de neutrófilos morfológicamente maduros, com núcleo segmentado, grande quantidade de grânulos em seu citoplasma, além de possuírem perfil pró-inflamatório devido a sua citotoxicidade e aumento na expressão de mediadores antitumorais. Atualmente, uma subpopulação heterogênea – imaturos e maduros - de neutrófilos de baixa densidade, chamada LDN (do inglês, “Low Density Neutrophils”), tornou-se foco de

estudo no contexto de diversas doenças. Esta subpopulação encontra-se colocalizada com células mononucleares na fração de PBMC após separação das células por um gradiente de densidade e, tem sido relacionada a gravidade de algumas doenças inflamatórias (Carmona-Rivera & Kaplan, 2013; Scapini & Cassatella, 2014).

Em 1986, Hacbarth & Kajdacsy-Balla identificaram por análises morfológicas, a presença de células com morfologia similar a neutrófilos na fração de PBMC de pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico, Artrite Reumatóide e Febre Reumática Aguda. Também foi observado que havia uma relação entre a frequência de LDNs encontrados e a quantidade de linfócitos dos pacientes. Porém, somente nos anos 2000 essa população de neutrófilos começou a ganhar notoriedade. Em um estudo publicado em 2003, analisou-se o padrão de expressão gênica em PBMC de pacientes com lúpus. Tal trabalho, identificou a presença de genes relacionados a neutrófilos diferencialmente expressos em pacientes com lúpus, quando comparados à controles saudáveis. Além disso, níveis elevados de LDNs em diferentes fases de maturação também foram observados na circulação dos pacientes (Bennet et al., 2003).

Ainda não existe consenso quanto à origem dos LDNs. Por essa população ser descrita como uma população mista de células, uma das hipóteses é a que sugere que os LDNs são liberados imaturos da medula óssea em resposta à estímulos inflamatórios. A outra hipótese é a de que neutrófilos ativados degranulam na circulação, alterando a sua densidade (Denny et al. 2010; Sagiv et al. 2015).

Análises fenotípicas de preparações de PBMC de pacientes com lúpus revelaram também que os LDNs destes pacientes são compostos por células ativadas, com frequência variante entre 1,2 – 54%, com média de 17% do total de PBMCs. No contexto do lúpus, os LDNs foram capazes de produzir níveis mais altos de mediadores pró-inflamatórios, como IFN do tipo 1, IFN- γ e TNF, e foram capazes de atuar sobre as células endoteliais, aumentando o dano vascular associado à patogenia da doença (Denny et al., 2010). Além do mais, também é descrito que LDNs de pacientes com lúpus possuem capacidade fagocítica reduzida, porém são mais propensos a formar NETs, favorecendo a inflamação crônica e a gravidade da doença (Denny et al., 2010; Garcia-Romo et al., 2011; Villanueva et al., 2011).

No lúpus, as NETs são descritas como uma das fontes de geração dos autoantígenos importantes na patogênese da doença, e a presença de moléculas pró-inflamatórias que constituem as NETs culmina em uma maior secreção de IFN, agravando a inflamação e os danos teciduais (Podolska et al., 2015).

No câncer, os LDNs foram descritos como uma população heterogênea, constituída tanto por células maduras quanto imaturas (Sionov et al., 2015). A presença de LDNs foi observada em pacientes com câncer de mama e pulmonar chegando em média a 18% do total de PBMCs. Nesses pacientes, os LDNs apresentaram fenótipo mais ativado devido a maior expressão de CD11b e CD66b quando comparados à HDNs. Além disso, foi observado que após incubação de LDNs em meio condicionado à 4-T1 (células de carcinoma mamário), os LDNs desenvolviam propriedades imunossupressoras, com diminuição na capacidade quimiotática, fagocítica e oxidativa pela redução na produção de H₂O₂, diferentemente dos HDNs. Esse estudo também foi um dos primeiros a sugerir que o TGF-β pode estar envolvido na capacidade de diferenciação de neutrófilos em LDNs, assim como o observado na polarização de neutrófilos em perfil N2 (Sagiv et al., 2015).

HDNs e LDNs expressam os mesmos marcadores moleculares relacionados a neutrófilos, como CD15, CD16, CD11b e CD66b, podendo haver diferenças nos níveis em que são expressos na membrana da célula, como visto em pacientes com adenocarcinoma pulmonar (Liu et al., 2017). Outro estudo em modelo de câncer mostrou LDNs com características pró-tumorais e imunossupressoras, como em pacientes com HIV, devido à expressão elevada de PDL-1 (Programmed death-ligand 1), uma molécula com propriedades imunomodulatórias que ao se ligar em seu receptor dispara sinais inibitórios em linfócitos. Altos níveis plasmáticos de proteínas presentes nos grânulos de neutrófilos, em especial Arginase-1, também foram observados nesses pacientes (Bowers et al., 2014).

Pillay e colaboradores (2012) observaram uma subpopulação de neutrófilos supressores circulantes hipersegmentados em pacientes com inflamação sistêmica aguda, com fenótipo CD16^{hi} CD62L^{low}. Essa população foi capaz de suprimir a proliferação de células T ativadas através da liberação de H₂O₂ nas sinapses imunológicas geradas pelo contato célula-célula entre o complexo de integrinas Mac-1 (CD11b / CD18). Esse mecanismo de supressão é similar ao que foi observado em

células dendríticas de camundongos (Varga et al., 2007). Estudos também demonstraram a presença de formas maduras de G-MDSCs, fortificando a ideia de populações heterogêneas de neutrófilos supressores (Dumitri et al., 2012; Youn et al., 2012; Wang et al., 2013; Lang et al., 2018). Outro estudo, observou a presença de LDNs maduros na cavidade peritoneal de pacientes com câncer gástrico, com fenótipo ativado devido a expressão aumentada dos marcadores CD15, CD66b, CD11b, CD63 e CD62L^{low}. Nesses pacientes, foi observado que os LDNs possuem a habilidade de formar NETs, as quais são mais adesivas e favorecem o desenvolvimento de metástases (Kanamaru et al., 2018).

Em pacientes com sepse, a presença de LDNs supressores foi correlacionado com a gravidade da doença e com a perda de função em células T CD8 e NK. Nesse trabalho, os pacientes sépticos apresentaram um aumento na expressão de PDL-1 na membrana dos neutrófilos, além de redução nas capacidades funcionais como a fagocitose (Patera et al., 2016). Esse resultado corrobora com os achados de um outro estudo em pacientes com sepse onde se identificou a presença de formas imaturas de neutrófilos com propriedades imunossupressoras, possivelmente LDNs (Guérin et al., 2014)

Surpreendentemente, LDNs já foram observados também em mulheres grávidas, sendo essa população responsável pela liberação elevada de arginase observada no sangue periférico e na placenta, induzindo mecanismos de imunossupressão necessários para a tolerância do sistema imunológico da mãe ao feto (Ssemaganda et al., 2014). A figura 1.8 demonstra as principais subpopulações de neutrófilos descritas no texto.

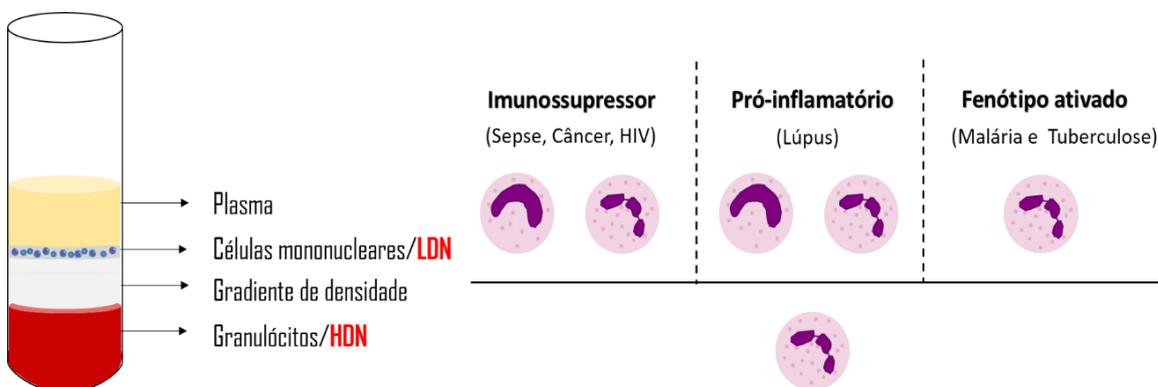


Figura 1.8. Subpopulações de neutrófilos isolados por gradiente de densidade. Na camada de células mononucleares há descritos LDNs: imaturos e maduros com perfil imunossupressor em pacientes com sepse, diversos tipos de câncer, e infectados por HIV; Pró-inflamatórios encontrado

em pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, e constituído por uma população mista de células imaturas e maduras; E em outras condições infecciosas como malária e tuberculose há descritos LDNs maduros com fenótipo de células ativadas sem perfil definido. Os HDNs são descritos classicamente como células maduras com propriedades pró-inflamatórias. (Fonte própria).

Em um estudo realizado com amostras de pacientes infectados com *Plasmodium vivax*, foi observada uma grande quantidade de LDNs com perfil ativado, pela análise dos marcadores CD66b, CD16, CD15 e CD11b na fração de PBMC com atividade fagocítica mantida, e maior capacidade de produzir ROS em relação aos HDNs. Também foi demonstrado nesse estudo que os LDNs dos pacientes com infecção aguda não expressavam marcadores relacionados à formas imaturas de neutrófilos e os HDNs liberaram níveis elevados de MPO, corroborando com a hipótese de que LDNs são gerados através de degranulação, nesse caso relacionada à infecção por *P. vivax*, e possivelmente contribuem para a inflamação sistêmica associada a doença (Rocha et al., 2015).

Sabendo que a hanseníase é uma doença altamente inflamatória, deve ser levado em consideração a possibilidade de subpopulações de neutrófilos estarem atuando na patogênese da doença, especialmente no ENH. A presença de um infiltrado de neutrófilos nos pacientes com ENH é um evento importante que pode sugerir o papel ativo dos neutrófilos no curso da doença (Kahawita & Lockwood, 2008).

A nossa hipótese é que neutrófilos degranulam na circulação, em resposta ao ambiente inflamatório induzido pelo *M. leprae*, gerando LDNs. E o aumento de LDNs contribui para a inflamação sistêmica associada ao ENH. Dessa forma, o presente estudo buscou caracterizar a presença de LDNs circulantes em pacientes ENH por meio de análises morfológicas e fenotípicas, e investigar o possível envolvimento da degranulação na geração de LDNs.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Identificar a presença de LDNs circulantes na hanseníase, em especial no ENH, e analisar o perfil fenotípico dessa subpopulação. Assim como, avaliar o envolvimento da degranulação como um mecanismo relacionado à geração de LDNs.

2.2. Objetivos específicos

1. Identificar subpopulação de LDNs circulantes em pacientes com hanseníase, comparando pacientes PB vs. MB e MB vs. ENH;
2. Analisar o perfil de ativação de LDNs comparando pacientes ENH e indivíduos não reacionais;
3. Avaliar se o tratamento com a talidomida interfere na presença e no perfil de LDNs de pacientes ENH através de acompanhamento longitudinal;
4. Avaliar o papel da degranulação na geração de LDNs em pacientes com hanseníase;
5. Avaliar se o *M. leprae* é capaz de induzir a geração de LDNs *in vitro*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental:

Este estudo foi delineado como estudo caso-controle em uma coorte de pacientes com hanseníase recém-detectados antes do tratamento. Os pacientes com hanseníase foram diagnosticados e classificados de acordo com os critérios de Ridley e Jopling (1966) e acompanhados no Ambulatório Souza Araújo (ASA), unidade clínica do Laboratório de Hanseníase (LAHAN) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), FIOCRUZ, no Rio de Janeiro. Pacientes com comorbidades infecciosas agudas ou crônicas, idade inferior a 18 anos, dependentes químicos e utilizando qualquer medicação no momento do diagnóstico não foram incluídos no estudo. Foram incluídos no estudo um total de 55 pacientes com hanseníase distribuídos entre as diferentes formas clínicas da doença. Nem todos os pacientes incluídos no estudo foram analisados por citometria de fluxo quanto a frequência de LDNs (Tabela 1).

Os casos de ENH foram selecionados entre os pacientes que tiveram o diagnóstico clínico confirmado por análises histopatológicas. Pacientes ENH tiveram acompanhamento longitudinal 7 dias após o início do tratamento com talidomida (100 ou 300 mg dose diária). A definição de caso de pacientes ENH foi realizada analisando a presença de nódulos cutâneos ou subcutâneos sensíveis a dor, acompanhadas ou não por febre, mal-estar ou outro envolvimento sistêmico. Os casos controles foram selecionados entre os pacientes com hanseníase BT e BL/LL sem reação no momento do diagnóstico inicial e antes do início do tratamento com PQT. Os pacientes com as formas clínicas BT e BL/LL foram chamados no presente estudo de PB e MB, respectivamente, de acordo com a classificação operacional da OMS. Todos os pacientes foram tratados conforme recomendado pela OMS. As amostras biológicas (sangue e pele) foram coletadas por profissionais capacitados no ASA e transportadas ao laboratório em caixa isotérmica. As amostras de pele foram utilizadas na rotina de diagnóstico dos pacientes. As amostras de sangue foram utilizadas para obtenção de soro e neutrófilos.

Tabela 1: Dados gerais de cada grupo de pacientes incluído no estudo.

Características	PB	MB	ENH
Sexo (Fem – Masc)	7 - 5	4 - 14	5 – 20
Mediana de idade (min – max)	50 (31 – 64)	50 (22 – 64)	47 (30 – 75)
Citometria <i>n</i> =	6	11	17
Elisa <i>n</i> =	11	13	19

3.2. Considerações éticas:

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres humanos do IOC/Fiocruz (CAAE 56113716.5.0000.5248). A participação de cada indivíduo incluído no estudo ocorreu após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

3.3. Escala de gravidade do ENH:

De acordo com a sintomatologia, os pacientes com ENH foram classificados clinicamente em ENH leve, moderado e grave (Ficha da escala de severidade em Anexo). Resumidamente, os pacientes que receberam a classificação de ENH leve não apresentavam sintomas sistêmicos e possuíam menos de 10 lesões cutâneas localizadas em poucas regiões. Nos pacientes classificados com ENH moderado observou-se presença entre 10 à 20 nódulos subcutâneos doloridos ao toque, em conjunto com febre moderada ($\leq 38,4^{\circ}\text{C}$) e outros sintomas sistêmicos discretos. Os classificados com ENH grave apresentavam mais de 20 nódulos subcutâneos doloridos distribuídos pelo corpo, além de lesões ulceradas, geralmente em mais de 5 regiões, febre alta ($\geq 38,5^{\circ}\text{C}$), entre outros sintomas sistêmicos (Schmitz et al., 2016).

3.4. Processamento do sangue para obtenção de LDN e HDN:

A manipulação do material biológico foi realizada na cabine de segurança biológica NB2 em ambiente estéril, respeitando as normas de precauções para a manipulação de material biológico. O sangue periférico heparinizado foi diluído 1:1 em tampão salina fosfato (PBS) para separação das células por gradiente de densidade em Ficoll Hyaque (GE Healthcare, Suécia) com densidade de 1,077 g/mL. Após centrifugação a 900 xg, sem freio, à 25°C, por 30 minutos, a fração de células mononucleares foi coletada e lavada duas vezes com PBS (500 xg, por 10 minutos, a 4°C). Em seguida, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 (LGC biotecnologia LTDA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS), L-glutamina a 2mM, penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 100mg/mL (meio completo). Uma pequena alíquota dessa suspensão celular foi diluída em azul de Tripán (Bio WHITTAKER, EUA) (1:20) e avaliada em câmara de Neubauer, para a estimativa da concentração de células viáveis. Da fração de PBMC foram obtidos os neutrófilos de baixa densidade (LDNs) colocalizados. Na fração de células vermelhas obtida após a centrifugação do gradiente de Ficoll, foi acrescentado 45 mL de solução de lise de eritrócitos ACK (1,7 M de NH₄Cl, 0,1M de KHCO₃ e 1 mM EDTA) durante 10 minutos por duas vezes seguido de centrifugação (500 xg, por 10 minutos, a 4°C). Em seguida o pellet contendo os neutrófilos de alta densidade (HDNs), foi lavado em PBS (500 xg, por 10 minutos, a 4°C) e ressuspensionado em meio completo para quantificação.

3.5. Análise morfológica das subpopulações de neutrófilos:

Para a preparação de lâminas em cytopspin, amostras contendo entre 1x10⁵ e 5x10⁵ células das subpopulações LDN e HDN separadas após processamento por Ficoll foram ressuspensionadas em meio completo. Em seguida as células foram submetidas à citocentrifugação em Cytospin à 60 xg durante 6 minutos, e subsequentemente, as células aderidas às lâminas foram coradas utilizando o Kit para coloração diferencial Panótico Rápido (Laborclin – solução de triarilmetano a 0,1%, xantenos 0,1% e tiazinas 0,1%). Ao final na coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico para análise da morfologia celular. A

imunofluorescência foi realizada através da aderência da fração de PBMC em lâminas por cytopspin, utilizando 5×10^5 células por lâmina. Em seguida, as células foram fixadas por 10 minutos em PFA 4%. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes em PBS 1X e permeabilizadas em 200 μ l de saponina 0,5% por 10 min, em câmara úmida à temperatura ambiente. Passado o tempo de permeabilização, as células foram novamente lavadas em PBS 1X e foi adicionado 200 μ l de tampão de bloqueio - 5 % Soro normal de cabra em PBS 1X , seguido de incubação por 30 minutos. As células foram lavadas e marcadas com o anticorpo anti-PTX3 FITC (Hycult) diluído 1:500 em tampão de bloqueio por 1 hora em câmara úmida, protegido da luz à 4°C. Ao final do tempo de marcação, foram realizadas novamente 3 lavagens, com posterior marcação com 200 μ l de DAPI 1x (Sigma-Aldrich) por 5 minutos. Após todo o processo, as lâminas foram lavadas 2 vezes em PBS 1x e foi realizada a montagem com 2 μ l de Permafluor (Thermo Scientific) posicionando uma lamínula sobre a lâmina contendo as células. Por fim, as lâminas foram vedadas com meio de montagem (Permount™ Mounting Medium; Fisher Chemical™/ Fisher Scientific), e analisadas no microscópio AxiObserver Z1 Colibri (Zeiss), sendo as imagens processadas no software AxioVision (Zeiss).

Para as análises por microscopia eletrônica de transmissão, a fração de PBMC contendo entre 2 à 5×10^6 células foi fixada em glutaraldeído 2,5% (Sigma-Aldrich) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 1 hora à 25°C. Em seguida, as amostras fixadas foram armazenadas em geladeira até o momento em que foram transportadas para processamento no Laboratório de Biologia Estrutural (IOC/Fiocruz). Lá as amostras foram lavadas no mesmo tampão e pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% (Sigma-Aldrich) contendo ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 2.5 mM por 1 hora à 4°C. Em seguida, as células foram centrifugadas e submetidas a desidratação em acetona. As amostras foram adicionadas à resina PolyBed 812 (Polysciences) para a polimerização e em seguida os cortes foram realizados e posicionados sobre grades. O contraste dos cortes foi realizado utilizando-se acetato de uranila 1%. As análises e fotografias foram realizadas no microscópio JEM-1011 (Jeol, Tóquio, Japão) da Plataforma de Microscopia Eletrônica do IOC.

3.6. Citometria de fluxo multiparamétrica:

LDNs foram analisados na fração de PBMC por citometria de fluxo. Inicialmente, foi feita a etapa de bloqueio no pellet contendo 5×10^5 células por tubo em volume de 10 μ L de solução de bloqueio (PBS/ BSA1% + 5% Soro Humano Inativado) por 20 minutos. Passada a etapa de bloqueio, foi adicionado o tampão (PBS/ BSA1%), seguido de marcação utilizando os anticorpos listados na tabela 2, em um volume final total de marcação de 50 μ L. As amostras foram incubadas por 30 minutos à 4°C, protegidas de luz. Passado o período de incubação, as células foram lavadas em 200 μ L de tampão, com centrifugação por 5 minutos à 325 xg, seguido de descarte do sobrenadante e fixação em PFA 4% durante 10 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas novamente e o pellet foi ressuspendido em 200 μ l de tampão. As amostras foram armazenadas protegidas de luz em geladeira até o momento da leitura. Para a leitura das amostras foi utilizado o citômetro BD FACSAria (BD Biosciences) da Plataforma Tecnológica da Fiocruz. Foram adquiridos 50.000 eventos por amostra dentro da região de granulócitos utilizando os parâmetros SSC x FSC.

Tabela 2: Descrição dos anticorpos utilizados nas análises por citometria de fluxo.

Anticorpos	Catálogo	Empresa	Diluição
CD15 PB (SSEA-1)	323024	Biolegend	1:200
CD15 PECy5 (SSEA-1)	323014	Biolegend	1:100
CD14 FITC	11-0149-42	eBioscience	1:100
CD14 PercP-Cy5.5	45-0149-42	eBioscience	1:100
CD11b PE	301306	Biolegend	1:100
CD16 PECy7	25-0168-42	eBioscience	1:100
CD62L FITC	14-0629-73	eBioscience	1:100
CD66b AF700	305113	Biolegend	1:100

3.7. Estratégia de análise

Os dados referentes às citometrias foram analisados utilizando o software FlowJo (BD Systems, USA). Primeiramente, realizamos o *gate* dos *singlets* com os parâmetros *forward scatter-height* (FSC-h) vs. FSC-a, altura e area respectivamente, para a exclusão de *doublets* (agregados celulares). Utilizando os parâmetros *side scatter* (SSC-a) e FSC-a realizamos o *gate* no PBMC eliminando debris celulares. Os LDNs foram caracterizados dentro do *gate* de PBMC como células CD15⁺CD14⁻ (Figura 3.1) (Denny et al., 2010). O marcador CD14 é utilizado classicamente para a identificação de monócitos e a expressão de CD15 é tradicionalmente utilizada para a identificação de neutrófilos periféricos, possibilitando assim a diferenciação desses dois tipos celulares.

Os LDNs foram analisados quanto a expressão de CD11b, CD16, CD66b e CD62L através da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) (Figura 3.1). Utilizamos como controle amostras marcadas com anti-CD14 e anti-CD15 sem a marcação dos receptores de interesse. Esse tipo de controle é atualmente utilizado em painéis com a marcação de múltiplos fluorocromos, e possibilita a identificação da entrada dos outros fluorocromos no canal de interesse. O valor da MFI da amostra controle foi subtraída da MFI da amostra marcada analisada para a adição dos dados nos gráficos.

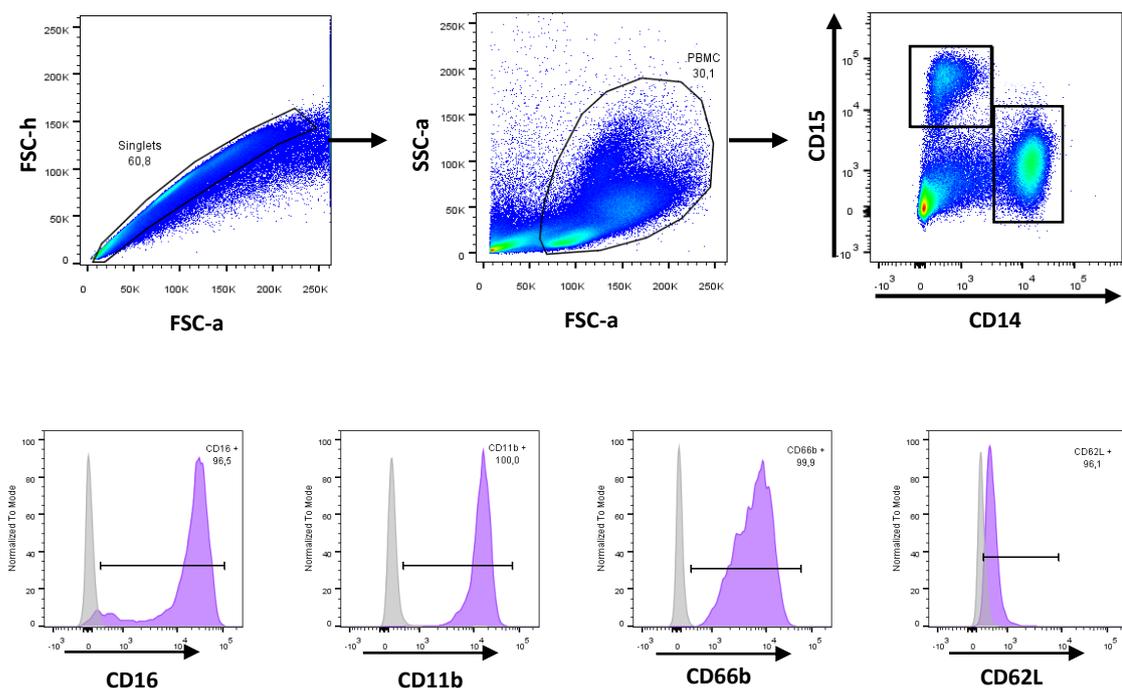


Figura 3.1. Esquema demonstrativo da estratégia de análise das citometrias de fluxo. Utilizando os parâmetros FSC-h vs. FSC-a foi realizada a seleção dos *singlets*. Em seguida realizamos o *gate* PBMC com os parâmetros SSC-a vs. FSC-a para a eliminação de debris celulares. Os LDNs foram identificados como CD15⁺CD14⁻. A expressão de CD16, CD11b, CD66b e CD62L nos LDNs foi analisado através da MFI comparando com amostras controle não marcadas com os anticorpos de interesse.

3.8. Dosagem de MMP-9 sérica por ELISA:

Os níveis séricos de MMP-9 foram avaliados por um kit comercial de ELISA (DY911 – R&D Systems) de acordo com o protocolo do fabricante. Placas de 96 poços de ELISA foram revestidas com anticorpos de captura anti-MMP-9 e mantidas na geladeira por 18 horas. Após lavagem das placas com tampão indicado pelo fabricante, adicionamos os soros diluídos 10 vezes nos poços destinados as amostras. Em paralelo, MMP-9 recombinante foi adicionada aos poços para geração da curva-padrão. O tempo de incubação foi de 2 horas. Após um novo ciclo de lavagem, adicionamos o anticorpo de detecção anti-MMP9. A reação foi revelada através do uso de Streptavidina-peroxidase e o substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina). Este ensaio detecta MMP-9 total tanto na sua forma ativa quanto na pró formada. O nível de detecção mínimo do kit é 31,2 pg/mL.

3.9 Geração de LDNs *in vitro*

Para a geração de LDNs *in vitro*, 2 mL de sangue total de 3 indivíduos sadios foram estimulados com *M. leprae* morto sonicado (BEI Resources) nas concentrações de 1, 5, 10 e 20 µg/mL durante 24 horas à 37° C. Passado o tempo do estímulo, o sangue total foi fracionado por centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque e a fração de PBMC foi analisada por citometria de fluxo utilizando os anticorpos anti-CD15 e anti-CD14 como já descrito anteriormente.

3.10 Análise estatística:

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM versão 5 (GraphPad Software, USA). Primeiro realizamos o teste de

normalidade D'Agostino-Pearson para observar a distribuição dos nossos dados. Para comparar os resultados de dois grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney não pareado, e o teste de Wilcoxon para amostras pareadas de distribuição não paramétrica. Para comparar mais de dois grupos de amostras não paramétricas, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Os coeficientes de correlação de Spearman ou Pearson foram utilizados quando apropriados, à depender da distribuição dos dados. As diferenças foram consideradas significativas a partir de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Classificação dos pacientes com ENH incluídos no estudo

O estudo compreendeu um total de 25 pacientes com ENH, sendo 80% da população de estudo do sexo masculino e 20% do sexo feminino com idade entre 30 e 75 anos. Os pacientes ENH apresentaram a reação antes, durante ou após a PQT. Onze pacientes com ENH foram analisados por citometria de fluxo quanto a frequência de LDNs circulantes e por Elisa quanto a degranulação de MMP-9 (Tabela 3).

Como foi brevemente citado na metodologia, a classificação clínica do ENH em leve, moderado e grave foi determinada de acordo com a sintomatologia clínica do paciente, sendo gerado um escore a partir de avaliações clínicas levando em conta: presença de febre, quantidade e extensão de lesões na pele, edema periférico e sinais sistêmicos (mal estar, cefaleia, queixas nasais e visuais, mialgia, dor testicular, dor óssea e neural, alteração de sensibilidade, cianose, fraqueza muscular, perda de peso, artralgia, parestesia e adenomegalia) (Schmitz et al., 2016). Dos 25 pacientes avaliados, 13 foram classificados com ENH Grave, 8 com ENH Leve e 4 com ENH Moderado.

Sete pacientes ENH foram acompanhados em dois momentos: (i) no diagnóstico da reação e (ii) 7 dias após o início do tratamento com talidomida; estes serão denominados ENH e ENH Tal, respectivamente. As características demográficas e clínicas dos pacientes ENH podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3: Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes ENH incluídos no estudo

Paciente	Idade	Sexo	Forma Clínica	Gravidade ENH	Ensaio
1	54	F	LL	Grave	Citometria e Elisa
2*	50	F	LL	Grave	Citometria e Elisa
3	35	M	LL	Grave	Citometria e Elisa
4*	40	M	LL	Grave	Citometria e Elisa
5*	38	M	LL	Moderado	Citometria
6*	52	M	LL	Leve	Citometria e Elisa
7*	64	M	LL	Moderado	Citometria e Elisa
8	73	M	LL	Grave	Citometria e Elisa
9	30	M	BL	Grave	Citometria
10*	47	M	LL	Leve	Citometria e Elisa
11	52	M	LL	Grave	Citometria
12	47	M	LL	Leve	Citometria e Elisa
13	50	M	BL	Grave	Citometria e Elisa
14*	75	M	LL	Grave	Citometria e Elisa
15	48	M	BL	Leve	Citometria
16	32	F	LL	Grave	Citometria
17	40	M	LL	Moderado	Citometria
18	34	M	LL	Leve	Citometria
19	38	M	BL	Leve	Citometria
20	39	M	LL	Moderado	Citometria
21	34	M	LL	Grave	Elisa
22	61	M	LL	Grave	Elisa
23	52	F	LL	Grave	Elisa
24	37	M	LL	Leve	Elisa
25	57	F	LL	Leve	Elisa
26	38	M	LL	Moderado	Elisa

Os pacientes identificados com * foram analisados no momento do diagnóstico de ENH e também 7 dias após o início do tratamento com talidomida. BL, forma borderline lepromatosa; LL, forma polar lepromatosa.

4.2 Presença de LDNs circulantes em pacientes com ENH

Atualmente, o ENH tem sido descrito como uma condição imunomediada por neutrófilos (Polycarpou et al., 2017). Sendo assim, buscamos identificar se havia a presença de subpopulações de neutrófilos circulantes de baixa densidade. Inicialmente, analisamos a presença de LDNs por análises morfológicas na fração de PBMC de pacientes com ENH, e observamos a presença de células morfológicamente similares a neutrófilos por microscopia de campo claro após coloração com Panótico (Figura 4.1 A). Além disso, foram realizadas análises por imunofluorescência através da marcação de PTX3, uma proteína exclusiva de grânulos secundários de neutrófilos (Jaillon et al., 2007), que confirmou a presença de células com núcleo multilobular e marcação positiva de PTX3 na fração de PBMC (Figura 4.1 B). Em todas as análises por microscopia de campo claro observamos a presença de neutrófilos morfológicamente maduros (>95%), segmentados e hipersegmentados, colocalizados com as células mononucleares.

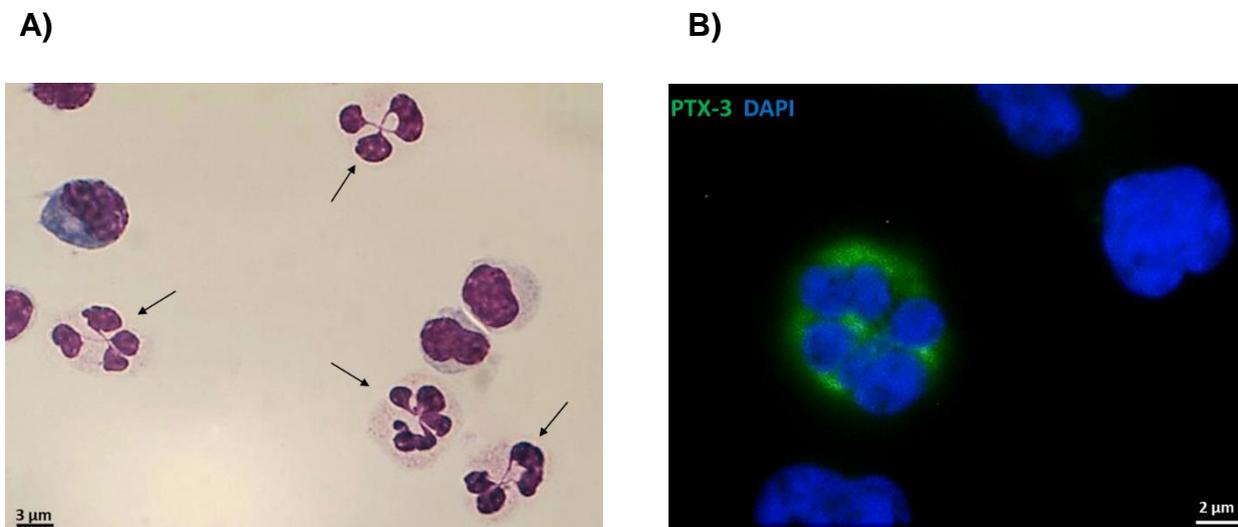
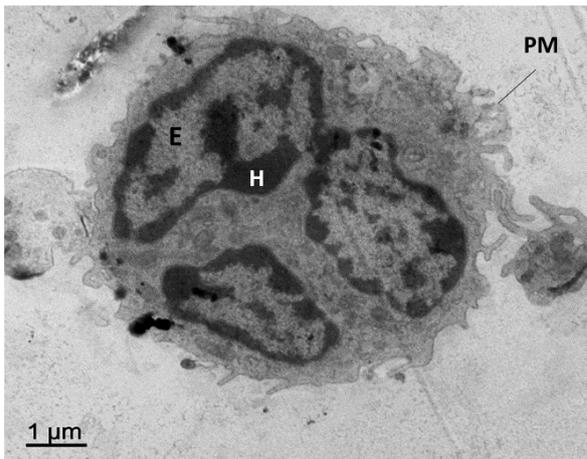


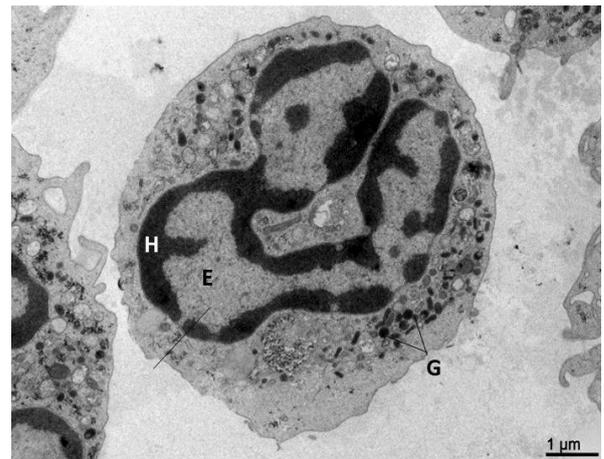
Figura 4.1: Presença de LDNs no sangue periférico de paciente com ENH. PBMC foi isolado após centrifugação do sangue periférico de pacientes ENH por gradiente de densidade. (A) Análise morfológica confirmando a presença de LDNs por coloração de Panótico Rápido. As setas indicam os LDNs; (B) Imunofluorescência com o marcador PTX-3 (marcação em verde – FITC) e DAPI (marcação em azul – núcleos). Imagens representativas de 1 indivíduo com ENH antes do início do tratamento da reação.

Realizamos também análises por microscopia eletrônica de transmissão, na qual comparamos morfológicamente LDNs e HDNs de pacientes ENH (Figura 4.2). Os LDNs foram analisados na fração de PBMC e os HDNs foram purificados a partir da fração de granulócitos após o processamento do sangue por gradiente Ficoll-Hypaque. Comparando as características morfológicas dessas duas subpopulações, observamos que ambas apresentam núcleo segmentado, sendo possível observar claramente suas lobulações, com a heterocromatina (parte mais densa) e eucromatina (parte descondensada) bem delimitadas (Figura 4.2). Não observamos presença de vacuolização e sinais de apoptose nos LDNs e HDNs (Figura 4.2). Vimos que os grânulos estão mais evidentes no citoplasma dos HDNs (Figura 4.2 B e D) do que nos LDNs (Figura 4.2 A e C). Além disso, observamos nos LDNs a presença de projeções de membrana (Figura 4.2 A e C).

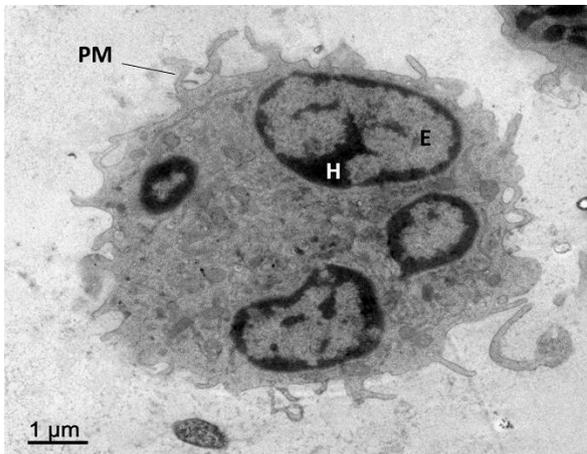
A)



B)



C)



D)

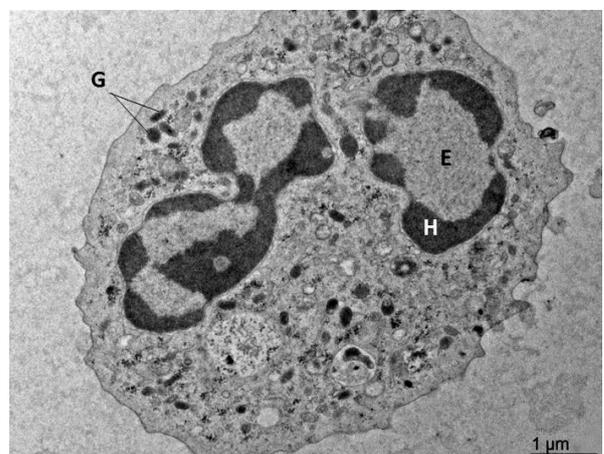


Figura 4.2: Análise da morfologia de LDNs e HDNs presentes no sangue periférico de pacientes

ENH por microscopia eletrônica de transmissão. Imagens representativas de LDNs e HDNs obtidos após processamento do sangue de 5 pacientes ENH por gradiente de densidade. (A e C) LDNs presentes na fração de PBMC de pacientes com ENH; (B e D) HDNs isolados da fração de granulócitos de pacientes ENH. H – heterocromatina; E – eucromatina; G – grânulos; PM – projeções de membrana.

Por citometria de fluxo, confirmamos a presença de LDNs na fração de PBMC de pacientes com ENH usando a marcação diferencial com base na expressão de CD15 e CD14 como descrito na literatura (Denny et al., 2010; Deng et al., 2016). Os LDNs foram classificados como CD15⁺CD14⁻, enquanto os monócitos foram classificados como células CD15⁻CD14⁺. Utilizando esse parâmetro, observamos que os pacientes com ENH possuíam células CD15⁺CD14⁻ na fração de PBMC (Figura 4.3).

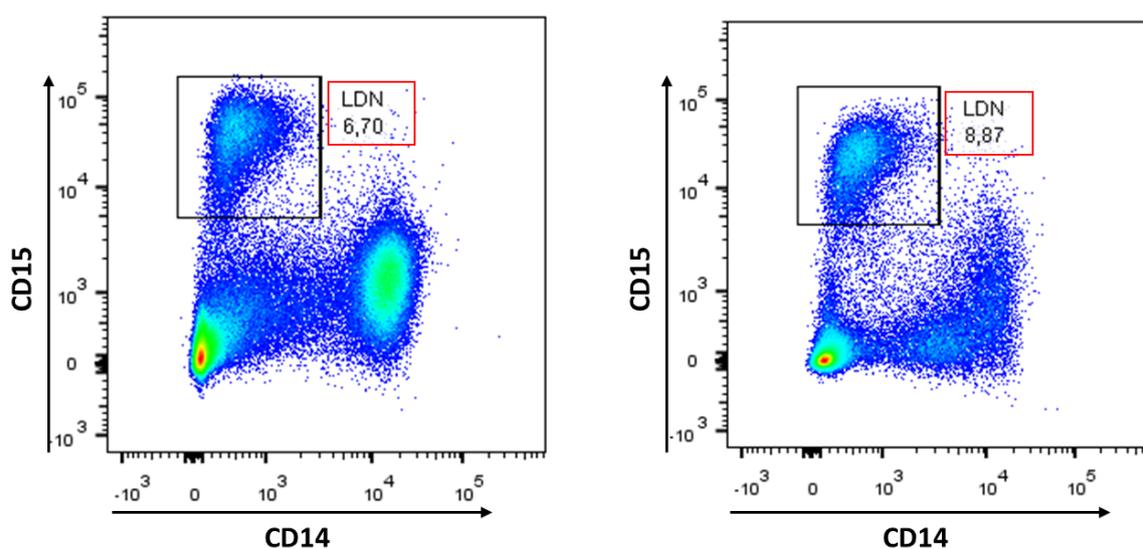


Figura 4.3: Presença de LDNs circulantes em pacientes com ENH analisada por citometria de fluxo. Fração de PBMC foi isolada após centrifugação do sangue periférico de pacientes ENH por gradiente de densidade. O gate nos LDNs foi realizado no PBMC usando o parâmetro CD15⁺CD14⁻ por citometria de fluxo. Gráfico dot plot representativo de 2 pacientes ENH grave.

4.3 LDNs elevados no ENH estão relacionados à gravidade da reação

Após confirmarmos a presença de LDNs em pacientes com ENH, buscamos identificar se esse fenômeno era exclusivo desse quadro clínico. Para isso analisamos a fração de PBMC de indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase PB e MB sem reação por microscopia e citometria de fluxo, utilizando os mesmos parâmetros de análise citados anteriormente. Os indivíduos saudáveis analisados no presente estudo possuíam frequência de LDNs inferior a 1% na circulação, não sendo possível observar essas células por microscopia, corroborando com a literatura (Figura 4.4). Observamos que pacientes com hanseníase PB e MB também apresentavam LDNs sendo essa presença ainda mais significativa (em torno de 4x maior) no quadro clínico de ENH (Figura 4.4). Vimos que os LDNs circulantes em pacientes PB e MB são morfologicamente maduros, com núcleo segmentado assim como o observado nos pacientes ENH (Figura 4.4).

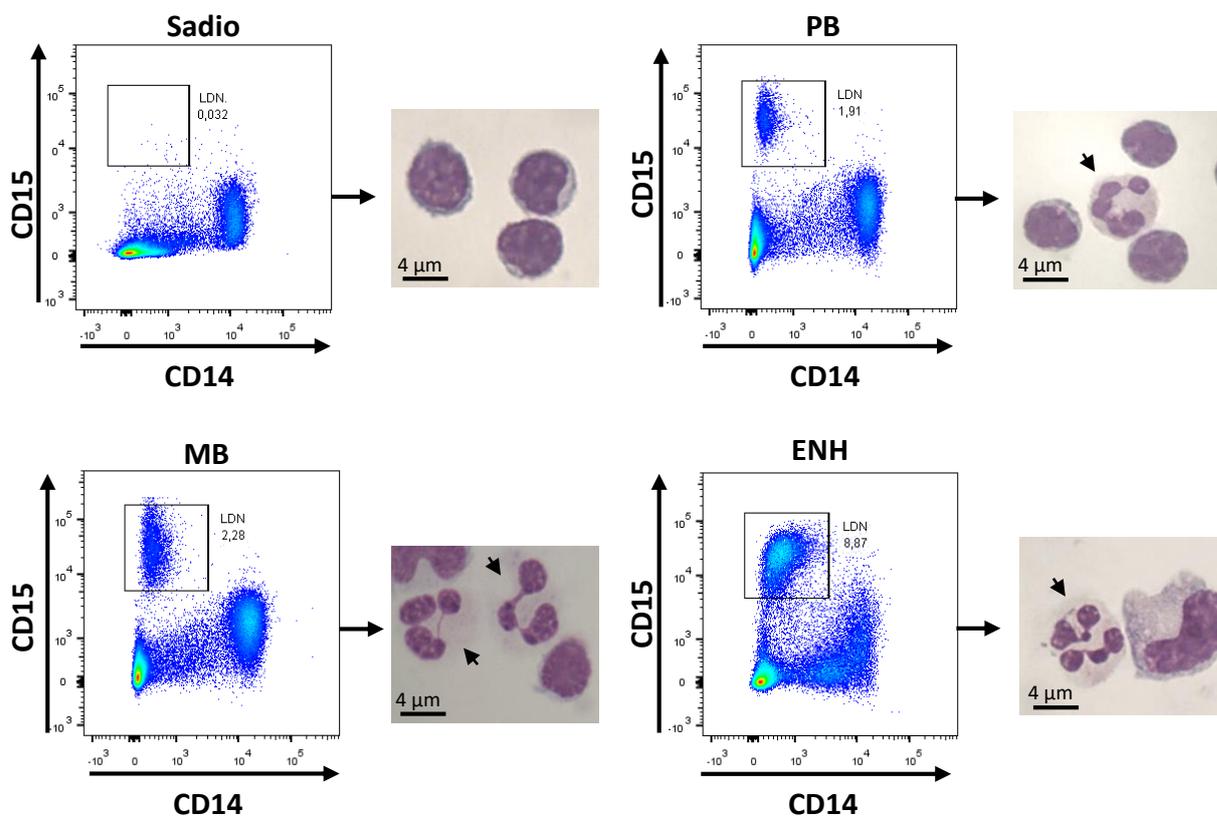


Figura 4.4: Pacientes ENH possuem mais células CD15⁺CD14⁻. O PBMC foi isolado após centrifugação do sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase PB, MB e ENH por gradiente de densidade. O gate nos LDNs foi realizado no PBMC usando o parâmetro

CD15⁺CD14⁻ por citometria de fluxo. Gráfico dot plot representativo de 1 indivíduo por grupo. Presença de LDNs por coloração de Panótico Rápido. As setas indicam os LDNs. PB, Paucibacilar; MB, Multibacilar; ENH, Eritema Nodoso Hansênico.

Após confirmação da presença de LDNs em pacientes com todas as formas da hanseníase, nós buscamos avaliar se havia diferença na frequência de distribuição dessa população comparando os níveis de LDNs entre pacientes de diferentes formas clínicas da hanseníase. Os resultados foram apresentados na forma de média \pm erro-padrão. Observamos que os pacientes MB apresentavam valores médios de frequência de LDN aproximadamente 1.5 vezes maior do que os pacientes PB (2.745 ± 0.8715 e 1.774 ± 0.7826 , respectivamente. $P= 0.6990$) (Figura 4.5 A). Quando comparados ao grupo controle sadio onde a frequência foi inferior a 1%, a diferença entre as médias foi ainda maior, cerca de 5.4 vezes superior nos pacientes PB (0.3250 ± 0.1258 e 1.774 ± 0.7826 , respectivamente. $P= 0.4244$), e 8.4 vezes maior no grupo de pacientes MB com diferença estatística significativa (0.3250 ± 0.1258 e 2.745 ± 0.8715 , respectivamente. $P= 0.0195$) (Figura 4.5 A). Além disso, também foi possível observar que os pacientes ENH possuem LDNs em níveis elevados quando comparados à pacientes MB (5.886 ± 1.494 e 2.745 ± 0.8715 , respectivamente. $P= 0.0393$) (Figura 4.5 B). A frequência mínima e máxima de LDNs circulantes entre os pacientes ENH incluídos no estudo foi de 1,04% e 28%, com 3,69 de mediana.

É descrito que o tratamento com a talidomida leva a uma diminuição do infiltrado inflamatório de neutrófilos nas lesões dos pacientes com ENH (Schmitz et al. 2016). Sendo assim, fomos investigar se o tratamento impactaria na presença de LDNs circulantes. Analisamos 7 pacientes ENH no momento do diagnóstico da reação e 7 dias após início do tratamento. De acordo com nossos dados, não há diferença significativa entre a frequência de LDNs antes e após o tratamento com talidomida (Figura 4.5 C). Dos 7 pacientes analisados, 4 apresentaram um aumento e 3 apresentaram uma diminuição na frequência de LDNs após tratamento.

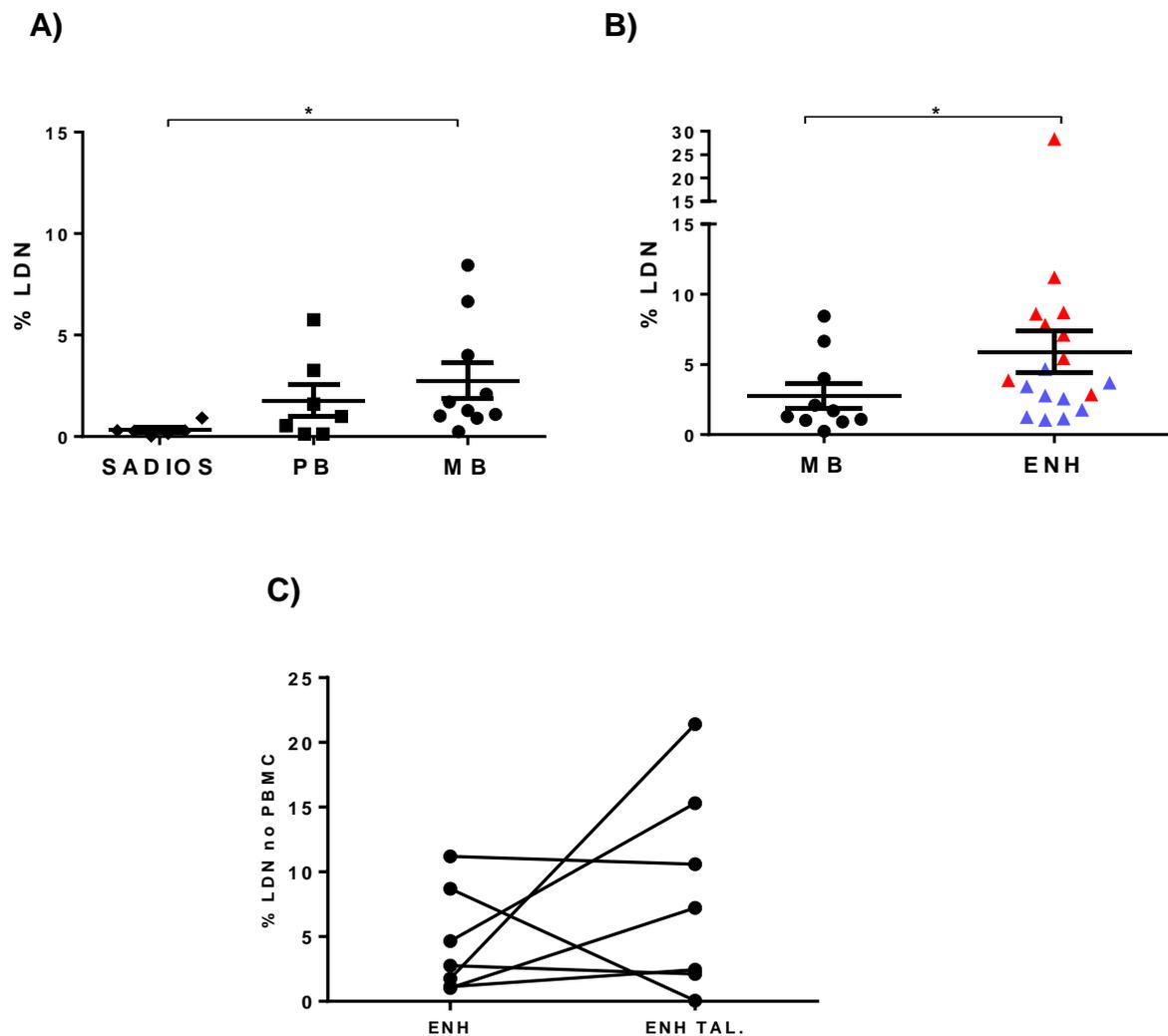


Figura 4.5: Frequência elevada de LDNs circulantes em pacientes com ENH. (A) Níveis de LDNs na circulação de indivíduos saudáveis e pacientes com hanseníase PB e MB; (B) Comparação entre os níveis de LDNs entre os grupos MB e ENH; (C) Análise dos níveis de LDNs em pacientes com ENH antes e após 7 dias de tratamento com talidomida. Pacientes indicados em vermelho apresentaram ENH grave, e em azul ENH leve ou moderado. PB, Paucibacilar; MB, Multibacilar; ENH, Eritema Nodoso Hansênico; ENH TAL., Eritema Nodoso Hansênico tratado com talidomida. As barras representam a média \pm erro-padrão. Cada ponto representa um indivíduo. Estatística: (A) Kruskal-Wallis; (B) Mann-Whitney; (C) Wilcoxon. * $P=0.0195$; * $P=0.0393$.

Alguns trabalhos observaram uma relação entre o aumento de LDNs e a frequência de linfócitos circulantes (Hacbarth & Kajdacsy-Balla, 1986; Liu et al., 2017). Nós buscamos avaliar se a frequência de LDNs em pacientes com

hanseníase está relacionada com a frequência de monócitos (MO) na fração de PBMC.

Avaliando a relação LDNs/MO, o grupo de pacientes ENH apresentou uma relação entre a frequência das células significativamente maior que os indivíduos sadios (0.7216 ± 0.2503 e 0.0275 ± 0.0081 , $P= 0.0036$) (Figura 4.6 A), assim como os pacientes MB (0.5906 ± 0.2790 e 0.0275 ± 0.0081 ; $P= 0.0296$). O tratamento com a talidomida não interferiu na relação LDNs/MO ($P= 0.8189$) (Figura 4.6 B).

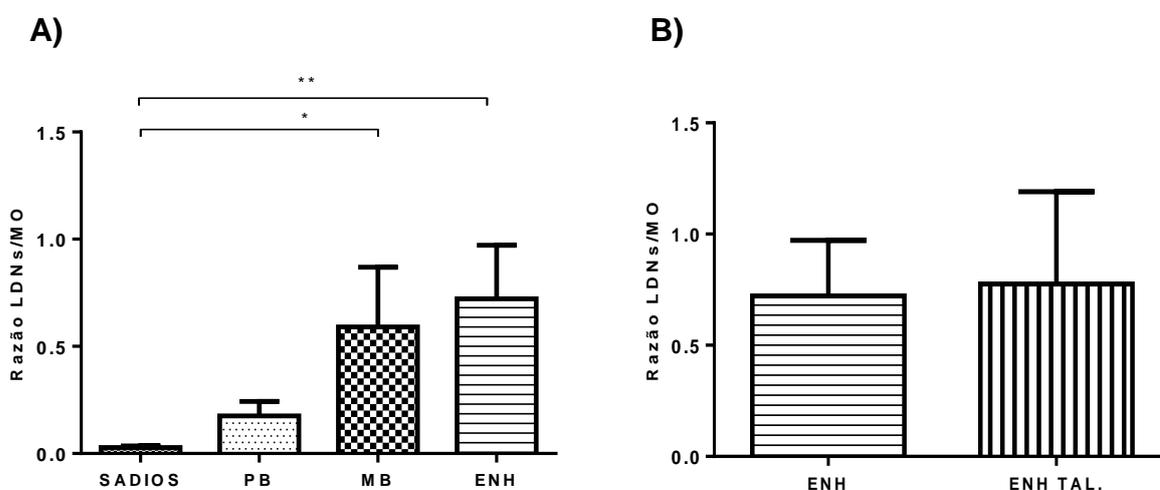


Figura 4.6: Razão entre frequência de LDNs com a frequência de monócitos em pacientes com hanseníase e indivíduos sadios. (A) Razão LDNs/MO comparando indivíduos sadios, pacientes PB, MB e ENH. (B) Razão LDNs/MO comparando pacientes ENH antes e após tratamento com talidomida. MO, monócitos; PB, Paucibacilar; MB, Multibacilar; ENH, Eritema Nodoso Hansênico; ENH TAL., Eritema Nodoso Hansênico tratado com talidomida. Estatística: (A) Kruskal-Wallis; (B) Mann-Whitney. * $P= 0.0296$; ** $P= 0.0036$.

Sabendo que os pacientes com ENH possuem níveis maiores de LDNs quando comparados aos outros grupos, fomos verificar se há uma relação entre a porcentagem de LDNs na circulação com a gravidade do ENH. Observamos que 10 dos 19 pacientes analisados por citometria de fluxo foram classificados com ENH grave (Tabela 3), os quais apresentaram um aumento significativo de LDNs quando comparados aos pacientes classificados como leve ou moderado (Figura 4.7), com média cerca de 3.2 vezes maior (8.487 ± 2.403 e 2.635 ± 0.4446 , respectivamente. $P= 0.0085$). Esse resultado mostra que há uma relação entre os níveis de LDNs e a gravidade do ENH.

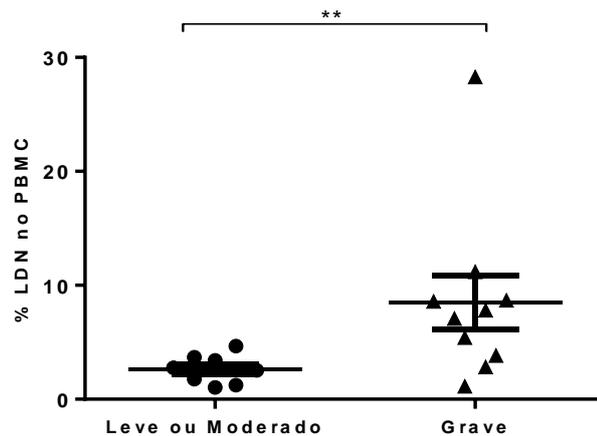


Figura 4.7: Pacientes com ENH grave apresentam mais LDNs circulantes. Comparação dos níveis de LDNs entre os pacientes classificados com ENH Grave (n= 10) e Leve ou Moderado (n= 9). As barras representam a média \pm erro-padrão. Cada ponto representa um indivíduo. Estatística: Mann-Whitney. $^{**}P= 0.0085$.

4.4 LDNs de pacientes com ENH possuem fenótipo mais ativado e a talidomida modula esse perfil

Trabalhos descrevendo LDNs mostraram a variação fenotípica que essa subpopulação pode apresentar por meio da expressão de alguns marcadores de ativação, incluindo CD11b, CD16, CD66b, CD62L e CD49d, à depender da doença em que estão associados (Sagiv et al., 2015; Kanamaru et al., 2018; Liu et al., 2017). Nesse contexto, fomos avaliar se os LDNs dos pacientes com ENH eram fenotipicamente diferentes dos LDNs dos pacientes MB. Avaliando a MFI para todos os marcadores analisados, nossos resultados não mostraram diferença significativa entre os grupos. Porém, analisando os valores das médias, observamos que os LDNs dos pacientes ENH apresentaram médias cerca de 2 vezes maior na expressão de CD11b (11827 ± 3602 e 5927 ± 1673 , respectivamente. $P= 0.3996$) (Figura 4.8 A), 1.1 vezes maior na expressão de CD16 (8110 ± 1940 e 7120 ± 3186 , respectivamente. $P= 0.4019$) quando comparados aos LDNs de pacientes MB (Figura 4.8 B). A expressão de CD66b foi cerca de 1.6 vezes maior nos pacientes ENH (4430 ± 1064 e 2708 ± 1212 , respectivamente. $P= 0.3818$) em comparação aos pacientes MB (Figura 4.8 C). No entanto, quanto à expressão de CD62L nos LDNs de pacientes ENH, observamos uma redução na média de cerca de 5 vezes no

grupo ENH em comparação à expressão do grupo MB (282.1 ± 47.01 e 1581 ± 813.1 , respectivamente. $P= 0.1455$) (Figura 4.8 D). Assim como, a média de expressão de CD49d foi 2 vezes reduzida nas células de pacientes ENH (138 ± 24.66 e 371 ± 188.1 , respectivamente $P= 0.2655$) (Figura 4.8 E). Esses resultados, em especial o aumento na expressão CD11b, e a redução de CD62L, embora não significativos, mostram que os LDNs dos pacientes com ENH apresentam uma tendência a um perfil mais ativado do que os LDNs dos outros grupos avaliados. Porém, é necessário aumentar o n amostral para chegarmos a uma conclusão definitiva.

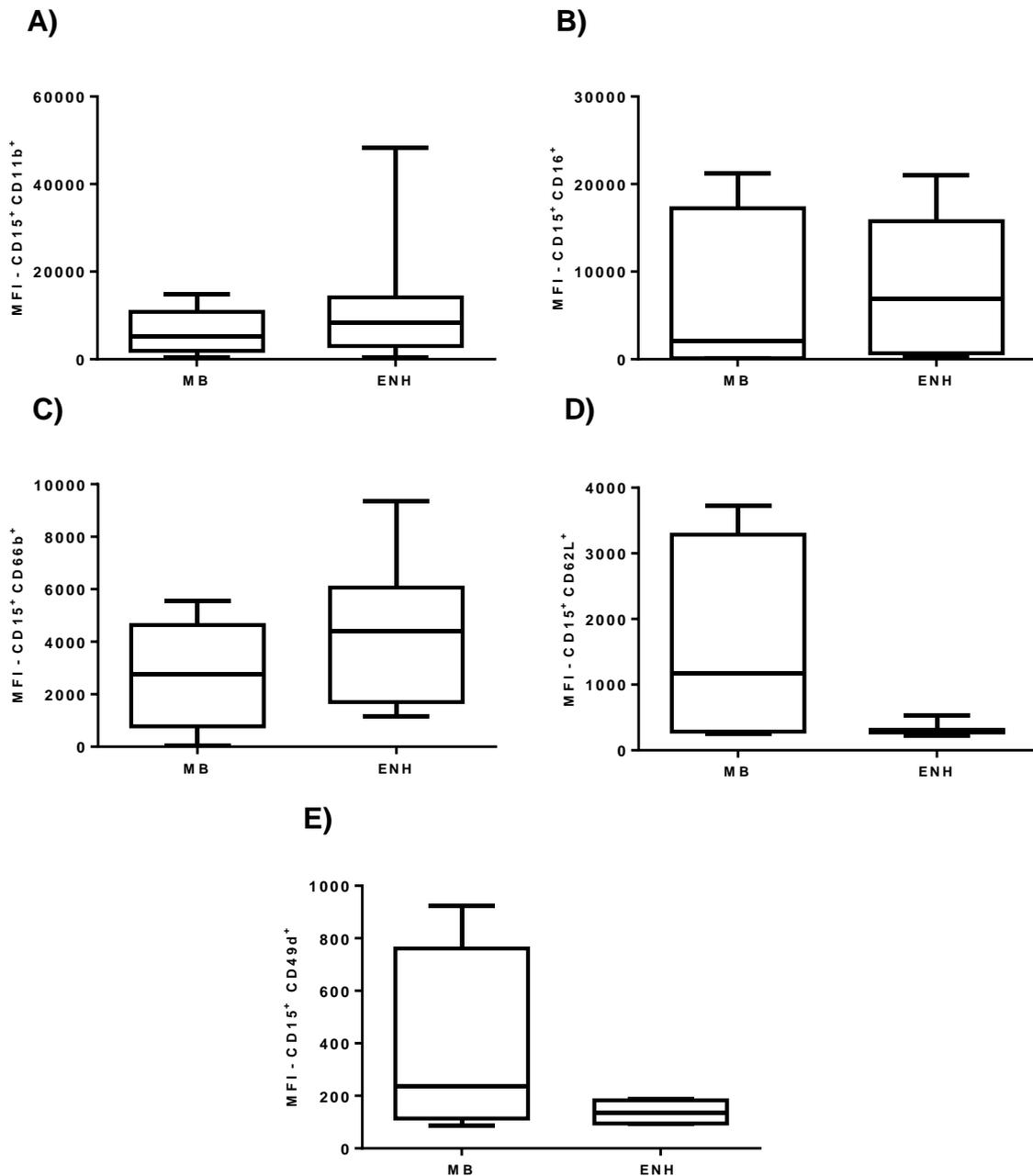


Figura 4.8: Níveis de expressão dos marcadores de superfície CD11b, CD16, CD66b, CD62L e CD49d. Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) de 5 marcadores de superfície de LDNs comparando pacientes MB vs. ENH. (A) MFI CD11B (MB n= 9, ENH n= 15); (B) MFI CD16 (MB n= 9, ENH n= 16); (C) MFI CD66b (MB n= 4, ENH n= 7); (D) MFI CD62L (MB n= 4, ENH n= 8); (E) MFI CD49d (MB n= 4, ENH n= 4). Box Plots mostram a mediana, intervalo interquartil e a amostra mínima e máxima de cada grupo. Estatística: Mann-Whitney.

Para avaliar se o tratamento com a talidomida influenciava na expressão desses marcadores de superfície, nós também comparamos os mesmos em pacientes ENH analisados no momento do diagnóstico e com 7 dias de tratamento. Nossos dados mostraram que a expressão de CD11b nos LDNs foi significativamente reduzida no grupo em tratamento, em comparação ao grupo avaliado no momento do diagnóstico, com média cerca de 3.4 vezes menor pós início do tratamento (3737 ± 1138 e 11827 ± 3602 , respectivamente. $P = 0.0354$) (Figura 4.9 A). Já a expressão de CD16 foi cerca de 4.6 vezes menor no grupo com tratamento quando comparado ao grupo ENH sem tratamento (3491 ± 1430 e 8110 ± 1940 , respectivamente. $P = 0.0297$) (Figura 4.9 B).

Além disso, embora não significativo, pela análise das médias observamos uma redução de cerca de 1.2 vezes na expressão de CD66b nos LDNs de pacientes ENH em tratamento (4431 ± 1064 e 3792 ± 1197 , respectivamente. $P= 0.7096$) (Figura 4.9 C), e um aumento de 2.9 vezes na expressão de CD62L (280.9 ± 47.93 e 813 ± 395.6 . $P= 0.6545$) (Figura 4.9 D). Esses resultados sugerem que o tratamento com talidomida leva a uma diminuição na ativação dos LDNs dos pacientes ENH.

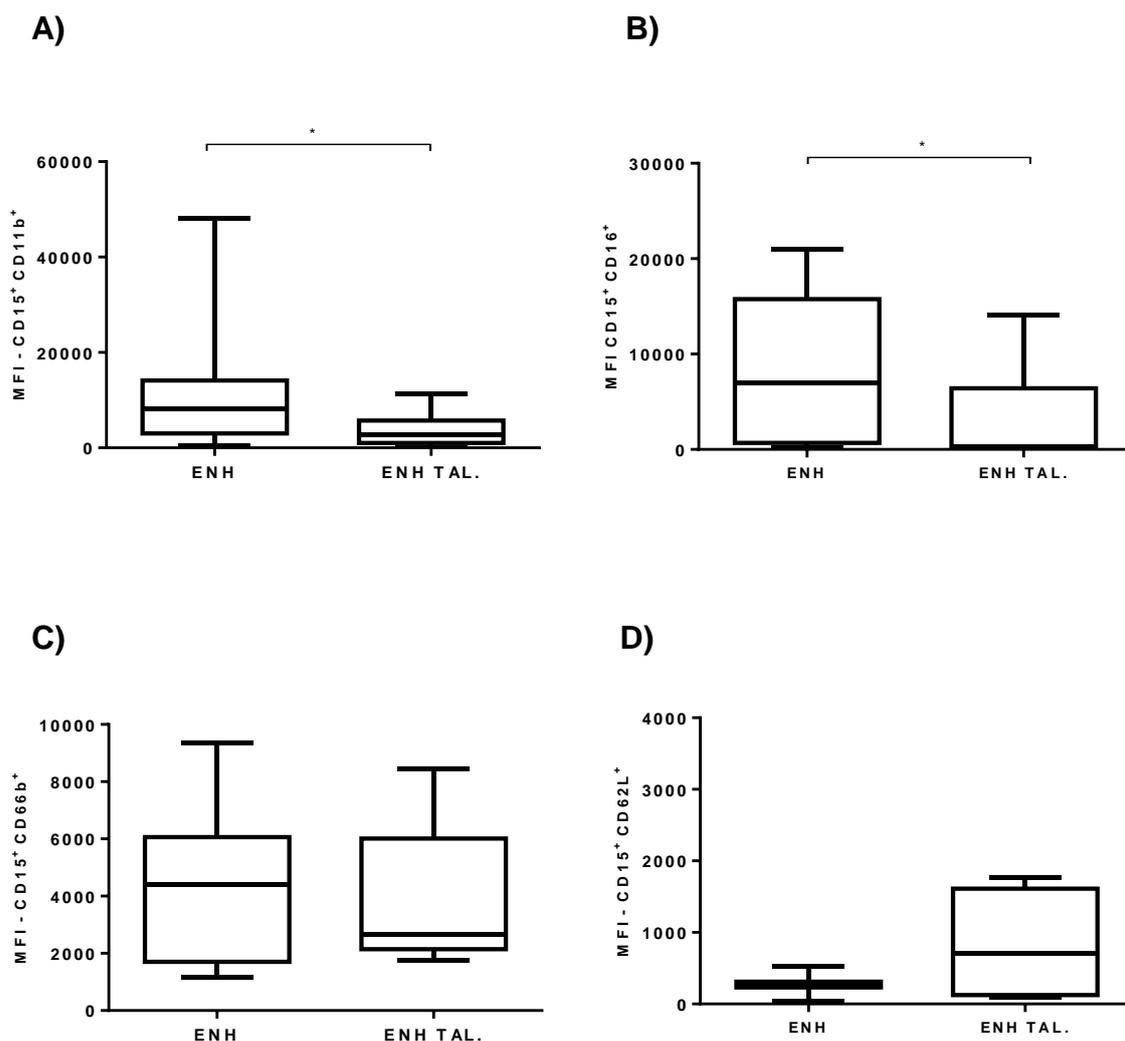


Figura 4.9: Níveis de expressão dos marcadores de superfície CD11b, CD16, CD66b e CD62L após início do tratamento com talidomida. Mediana de intensidade de fluorescência (MFI) dos marcadores de superfície de LDNs comparando pacientes ENH vs. ENH TAL. (A) MFI CD11B (ENH n= 14, ENH TAL. n= 10); (B) MFI CD16 (ENH n= 16, ENH TAL. n= 11); (C) MFI CD66b (ENH n= 7, ENH TAL. n= 5); (D) MFI CD62L (ENH n= 8, ENH TAL. n= 4). Box Plots mostram a mediana, intervalo interquartil e a amostra mínima e máxima de cada grupo. Estatística: Mann-Whitney. * $P= 0.0354$; * $P= 0.0297$.

4.5 LDNs surgem através de degranulação

A etiologia dos LDNs ainda é incerta, porém muitos trabalhos sugerem a degranulação como o mecanismo associado a origem dessa subpopulação de neutrófilos de baixa densidade (Bowers et al., 2014; Rocha et al., 2015). Para tentar caracterizar a fonte dos LDNs nos pacientes com hanseníase, nós analisamos por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) a presença do marcador neutrofílico de degranulação MMP-9.

Foi observado que os níveis de MMP-9 no soro (expresso como pg/mL) dos pacientes ENH analisados foi significativamente maior do que no soro dos pacientes PB (56231 ± 12858 e 12309 ± 1653 , $P= 0.0045$) (Figura 4.10 A). Quando comparados os níveis de MMP-9 no soro dos pacientes PB com os níveis dos pacientes MB, também observamos um aumento significativo no grupo MB (12309 ± 1653 e 35215 ± 4852 , $P= 0.0211$). Não observamos diferença significativa entre os grupos MB e ENH, assim como no soro dos pacientes que foram avaliados no momento do diagnóstico e 7 dias após tratamento (46563 ± 17415 e 59249 ± 16067 , respectivamente) (Figura 4.10 B).

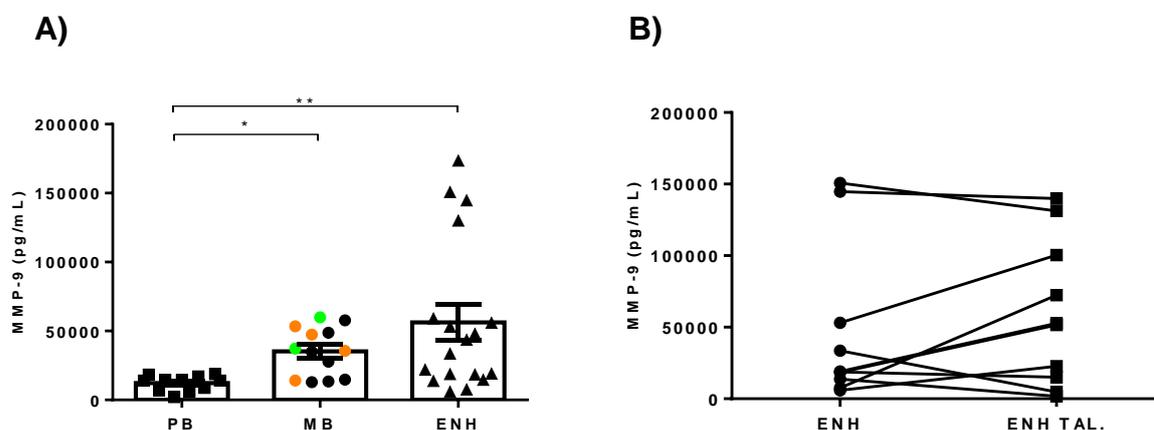


Figura 4.10: Degranulação de MMP-9. (A) Níveis de MMP-9 no soro de pacientes com hanseníase PB (n = 11), MB (n = 14) e ENH (n = 18). (B) Comparação entre os níveis de MMP-9 entre os grupos ENH e ENH TAL. (n= 10). Indicados em verde pacientes que evoluíram para Reação Reversa e em coral para ENH após a análise. PB, Paucibacilar; MB, Multibacilar; ENH, Eritema Nodoso Hansênico; ENH TAL., Eritema Nodoso Hansênico tratado com talidomida. Estatística: (A) Kruskal-Wallis; (B) Wilcoxon. * $P= 0.0211$; ** $P= 0.0042$.

Além disso, amostras de alguns pacientes MB e ENH foram analisadas em conjunto quanto a frequência de LDNs por citometria de fluxo, e quanto ao nível de MMP-9 no soro por elisa. Interessantemente, a partir dessas análises verificamos uma correlação positiva entre a frequência de LDNs e os níveis de MMP-9 degranulados no soro dos pacientes MB ($r = 0.7619$; $P = 0.0368$), e ENH ($r = 0.6970$; $P = 0.0306$) (Figura 4.11 A e B). Esses resultados indicam que pacientes com ENH degranulam mais MMP-9, e a degranulação está estritamente relacionada com o aumento de LDNs na circulação desses pacientes, possivelmente sendo uma importante fonte de geração dessas células.

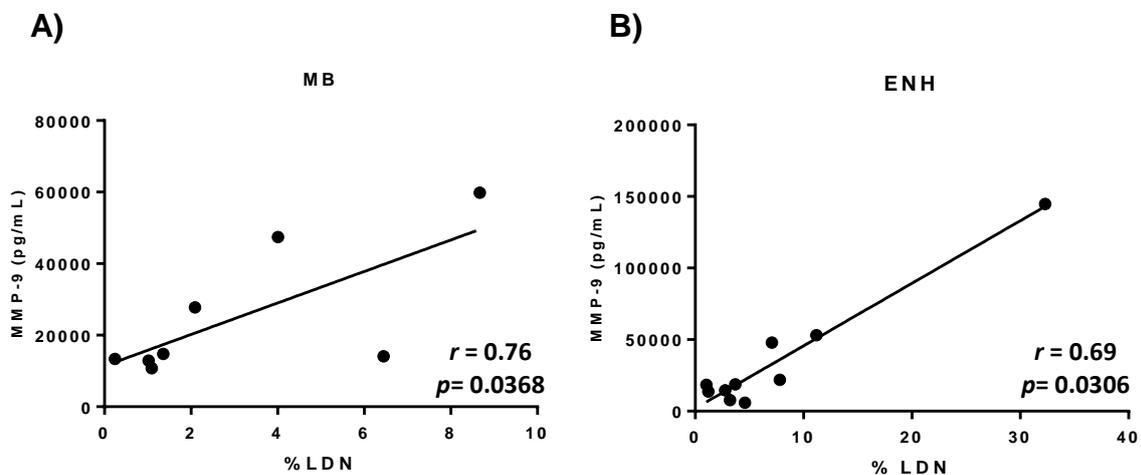


Figura 4.11: Frequência de LDNs circulantes está correlacionada com a degranulação de MMP-9 *in vivo*. (A) Correlação entre os níveis de MMP-9 no soro e LDNs circulantes de pacientes MB ($n = 8$). (B) Correlação entre os níveis de MMP-9 no soro e LDNs circulantes em pacientes com ENH ($n = 10$). MB, Multibacilar; ENH, Eritema Nodoso Hansênico. Estatística: Coeficiente de correlação de Spearman. O valor do coeficiente de correlação (r), e o valor de p estão indicados em cada correlação. As linhas representam as análises de regressão linear.

4.6. *M. leprae* induz geração de LDNs *in vitro*

Como citado anteriormente, a presença de alguns microrganismos favorece a geração de LDNs. Após a confirmação de que pacientes com as diferentes formas da hanseníase possuem LDNs na circulação, nos perguntamos se fragmentos de *M. leprae* poderiam ser capazes de influenciar na produção dessas células. Para responder a essa pergunta, sangue total de indivíduos saudáveis foi estimulado com *M. leprae* sonificado em diferentes concentrações por 24 horas e processados por gradiente de densidade. As análises dos níveis de LDNs foram realizadas por citometria de fluxo utilizando a estratégia de gate CD15⁺CD14⁻ no PBMC. A partir do gate, vimos pouca presença de células CD15⁺CD14⁻ na amostra controle não estimulada (Figura 4.12 A), seguido de um aumento na frequência de células CD15⁺CD14⁻ de acordo com o aumento na concentração do estímulo de *M. leprae* de 1 µg/mL (Figura 4.12 B) para 5 µg/mL (Figura 4.12 C) e 10 µg/mL (Figura 4.12 D). Na concentração de 20 µg/mL (Figura 4.12 E e F) não observamos aumento.

Os dados mostram que há um aumento nos níveis de LDNs gerados de maneira dose dependente (Figura 4.12 F), com aumento significativo no estímulo de 10 µg/mL ($P= 0.0181$) (Figura 4.12 F). Com estímulo nas concentrações de 1 µg/mL (13.88 ± 3.519) e 5 µg/mL (21.37 ± 2.275) observamos aumento de cerca de 3.8 e 6 vezes, respectivamente, na frequência de LDNs gerados quando comparados ao controle não estimulado (3.58 ± 1.263) (Figura 4.12 F). Vimos também que com o estímulo de 20 µg/mL, os níveis de LDNs foram reduzidos 1.2 vezes em comparação aos níveis gerados com estímulo de 10 µg/mL (21.87 ± 3.122 e 27.13 ± 6.431 , respectivamente) (Figura 4.12 F). Esse resultado mostra que a infecção por *M. leprae* é capaz de favorecer a geração de LDNs em sangue periférico.

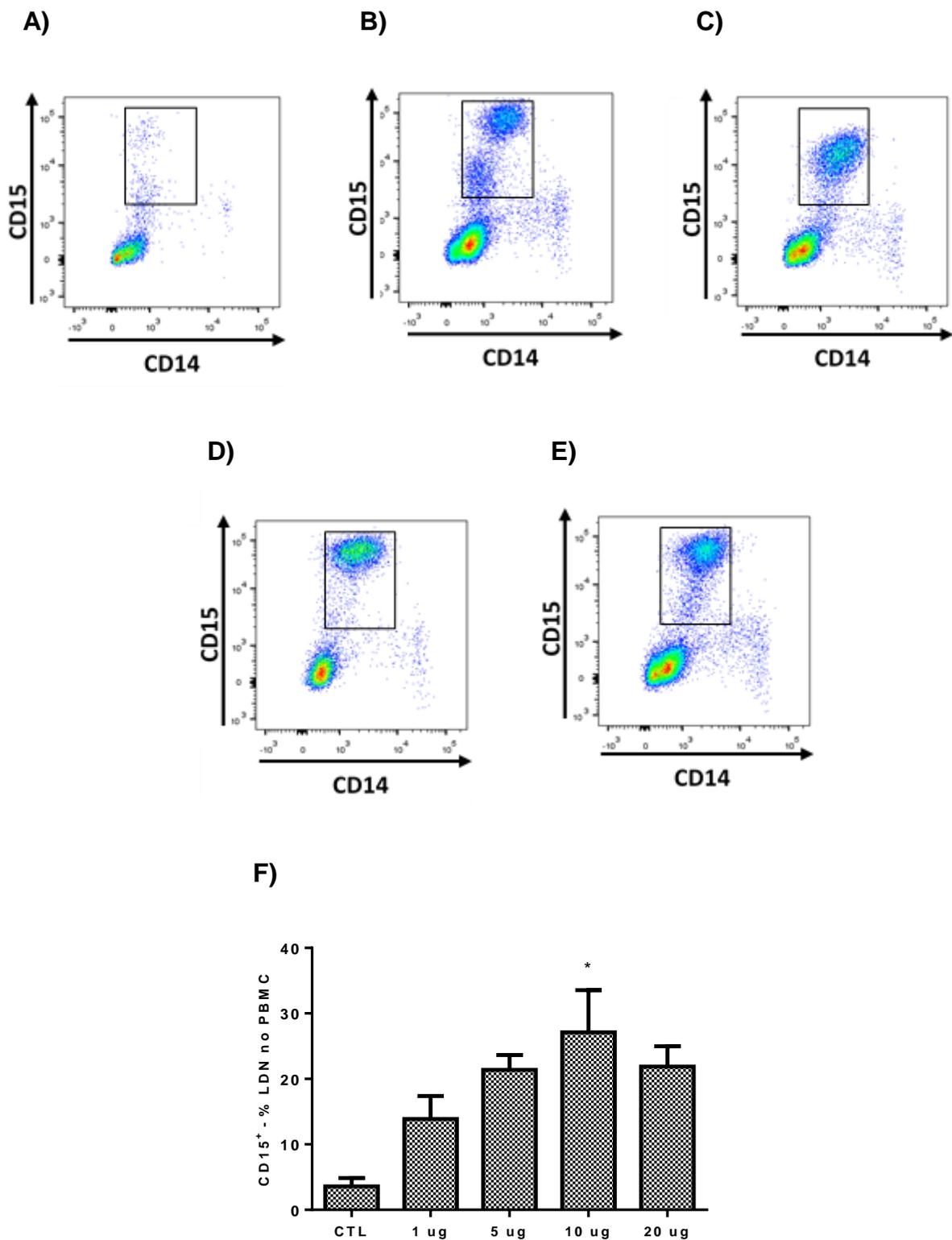


Figura 4.12: Aumento na frequência de LDNs gerados após infecção *in vitro* com *M. leprae*. Gráficos dot plot representativos de sangue total de 1 indivíduo estimulado com *M. leprae* sonificado. (A) Controle não estimulado; (B) concentração de 1 µg/mL; (C) 5 µg/mL; (D) 10 µg/mL; (E) 20 µg/mL; (F) Frequência de LDNs em sangue periférico de indivíduos saudáveis estimulados com *M. lepraes*onificado nas concentrações indicadas ($n=3$). (B) Estatística: Friedman. * $P=0.0181$.

Tendo em vista que a expressão de CD66b na superfície da célula tem sido relacionada a atividade de degranulação de neutrófilos (Naegelen et al., 2015), analisamos a expressão desse marcador em LDNs gerados diante de estímulos com *M. leprae* em diferentes concentrações. Nos LDNs gerados por estímulo com *M. leprae* observamos que há um aumento na expressão de CD66b em LDNs. Observamos, ainda, que no estímulo de 1 µg/mL há a presença de uma subpopulação de LDNs CD15⁺CD66b⁺ e outra subpopulação CD15⁺CD66b⁻ (Figura 4.13 B). No estímulo de 5 µg/mL também observamos esse evento, porém com um aumento na frequência de LDNs CD15⁺CD66b⁺ (Figura 4.13 C). Com 10 µg/mL, concentração em que notamos um aumento significativo de LDNs (Figura 4.12 F), observamos 97,4 % dos LDNs analisados como células CD15⁺CD66b⁺ (Figura 4.13 D). Na análise das amostras estimuladas com 20 µg/mL, observamos uma diminuição dos LDNs CD15⁺CD66b⁺, com aumento na frequência de uma população CD15⁺CD66b⁻ (Figura 4.13 E). O aumento na expressão de CD66b pelos LDNs gerados nas diferentes concentrações de *M. leprae*, em conjunto com o aumento na frequência de LDNs *in vitro* (Figura 4.12) reafirma que a degranulação possui um papel importante na geração dos LDNs.

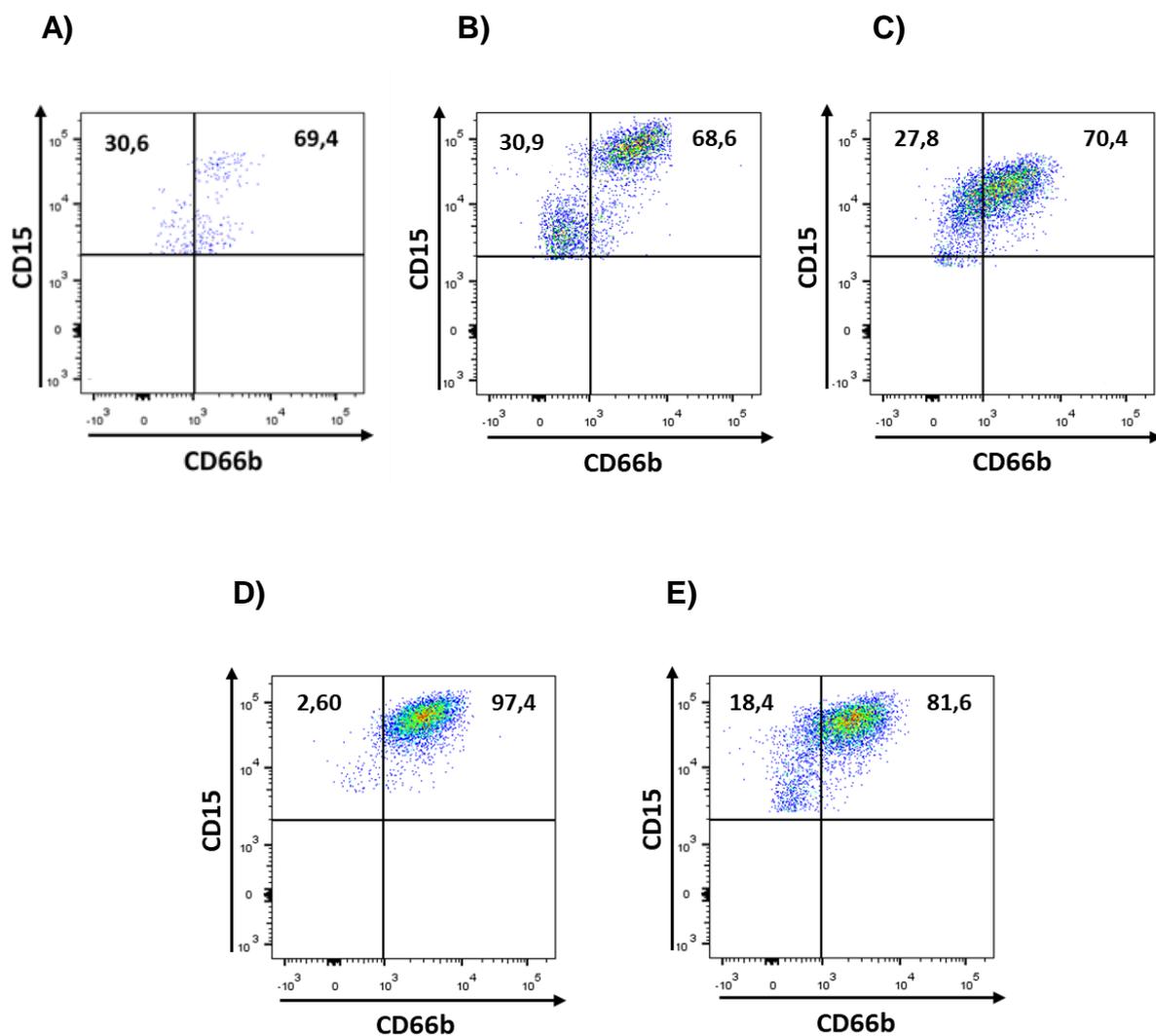


Figura 4.13: Aumento na expressão de CD66b por LDNs gerados por estímulo *in vitro* com *M. leprae*. Gráficos dot plot representativos da análise da expressão de CD66b por LDNs. (A) Controle não estimulado; (B) concentração de 1 µg/mL; (C) 5 µg/mL; (D) 10 µg/mL; (E) 20 µg/mL. ($n= 2$).

5. DISCUSSÃO

A inflamação sistêmica associada ao ENH é considerada um importante fator relacionado às morbidades associadas à hanseníase, agravando os danos neurais e contribuindo para o desenvolvimento de incapacidades e deformidades físicas. Um dos desafios atuais no manejo dos pacientes com hanseníase é o desenvolvimento de ferramentas que possam prever quais pacientes irão evoluir para um quadro de ENH. Um outro gargalo na área é o tratamento destes pacientes que precisa ser rápido e efetivo afim de evitar os danos permanentes. O ENH pode ocorrer antes, durante ou após a PQT, embora seja mais frequentemente observado durante os primeiros meses de tratamento. Acredita-se que o surgimento do ENH tenha relação com a destruição do *M. leprae*, e a liberação de antígenos do bacilo, hiperativando o sistema imune na tentativa de eliminar esses antígenos (Geluk, 2018). Apesar dos avanços realizados na compreensão da imunopatologia da hanseníase, os mecanismos que desencadeiam o ENH ainda não são totalmente conhecidos.

Embora o primeiro trabalho apontando a existência dos LDNs tenha observado a capacidade de fatores presentes no soro de pacientes com hanseníase MB de induzir um aumento na presença dessa população em sangue total de indivíduos saudáveis (Hacbarth & Kajdacsy-Balla, 1986), a presença de LDNs na circulação desses pacientes ainda não tinha sido descrita.

O nosso presente estudo foi o primeiro a identificar a presença de LDNs no sangue periférico de pacientes ENH. Assim como foi visto em diversas doenças como HIV, malária, leishmaniose, câncer, lúpus e sepse (Bowers et al., 2014; Rocha et al., 2015; Abebe et al., 2013; Sharma et al., 2016; Sionov et al., 2015; Sagiv et al., 2015; Denny et al., 2010; Garcia-Romo et al., 2011; Patera et al., 2016). O lúpus e a sepse são consideradas doenças que se assemelham ao ENH, pela presença de episódios inflamatórios agudos durante o curso da doença, a inflamação sistêmica, além de terem o neutrófilo atuando como peça chave nas suas patogenias (Denny et al., 2010; Garcia-Romo et al., 2011; Patera et al., 2016).

A análise dos níveis de LDNs ao longo do espectro da hanseníase revelou que pacientes multibacilares não reacionais apresentavam mais LDNs na circulação quando comparados aos paucibacilares. Na literatura, a origem dos LDNs é controversa devido a heterogeneidade na sua morfologia e na expressão de

marcadores. Esses resultados sugerem que a presença do *M. leprae* é um fator importante para o aparecimento dos LDNs, visto que pacientes paucibacilares apresentam raros ou nenhum bacilo nas lesões (Ridley & Jopling, 1962). De fato, a presença de LDNs na circulação de pacientes ENH foi mais robusta e consistente, revelando também uma correlação entre a gravidade do quadro de ENH, assim como foi observado na infecção por *M. tuberculosis* e na sepse (Deng et al., 2016; Patera et al., 2016). É sabido que as proteínas dos grânulos de neutrófilos quando liberadas podem amplificar o processo inflamatório (Lacy, 2006). A presença de LDNs em pacientes multibacilares no momento do diagnóstico poderia servir como um biomarcador preditivo, diagnóstico e de gravidade do ENH. Estudos futuros multicêntricos poderiam validar esses achados.

O aumento nos níveis plasmáticos de PTX3, uma proteína presente constitutivamente nos grânulos de neutrófilos, em pacientes MB com e sem ENH, e a colocalização de PTX3 e MPO nas lesões de pacientes ENH, sugere que os neutrófilos através da degranulação de seus mediadores têm um papel importante na patogenia do ENH (Mendes et al. 2017). No nosso estudo, observamos que os níveis de MMP-9, uma proteína presente nos grânulos terciários de neutrófilos, estão aumentados no soro de pacientes com hanseníase MB e com ENH. Vale ressaltar que em lesões de pacientes com ENH foi demonstrado aumento de mRNA de MMP-2 e MMP-9 quando comparados a pacientes com hanseníase sem reação (Teles et al., 2010). Diferentemente do estudo de Teles e col. (2010), no qual foi verificado níveis séricos maiores de MMP-9 nos pacientes paucibacilares, no nosso grupo de estudo observamos um aumento apenas nos pacientes multibacilares. Além de analisarmos uma quantidade maior de pacientes, no grupo MB tivemos 6 pacientes que pouco tempo após as análises desenvolveram algum tipo de reação, seja RR ou ENH. Isso pode explicar a divergência entre os resultados desses dois estudos.

A expressão elevada de CD11b e CD66b na membrana da célula é relacionada à ativação e degranulação de neutrófilos, visto que são moléculas constitutivamente presentes nas membranas dos grânulos de neutrófilos, e no mecanismo de exocitose dos grânulos, as membranas se fundem, gerando um aumento desses marcadores na superfície da célula (Naegelen et al., 2015; Cowland & Borregaard, 2016). Dessa forma, o aumento desses marcadores nos LDNs dos pacientes ENH, grupo no qual observamos uma frequência maior de LDNs, e a

correlação entre os níveis de MMP-9 séricos e os LDNs circulantes, corrobora com a hipótese de que essa subpopulação é gerada pela degranulação de HDNs ativados, assim como foi sugerido em outros estudos (Rocha et al., 2015; Liu et al., 2017; Deng et al., 2016).

Como prova de conceito, nós avaliamos se o *M. leprae* é capaz de induzir geração de LDNs *in vitro*. Após estímulo de sangue total com lisado de *M. leprae*, que mimetiza o ambiente do quadro de ENH devido à presença de bacilos fragmentados, foi possível observar geração de LDNs no sangue total de maneira dose dependente. Observamos que mesmo a concentração mais baixa, de 1 µg/mL foi capaz de levar ao aumento na frequência de LDNs, sendo o estímulo de 10 µg/mL o mais eficaz. Além disso, notamos que com 20 µg/mL há um decaimento na frequência dessa população. O que sugere que altos níveis de antígenos de *M. leprae* pode favorecer um mecanismo de exaustão na geração de LDNs. Como mostrado por Deng e colaboradores, a infecção por *M. tuberculosis* induz a geração de LDNs em sangue total, inclusive sendo capaz de levar a conversão de HDNs em LDNs (Deng et al., 2016). No mesmo estudo, eles também relacionaram a capacidade do *M. tuberculosis* gerar LDNs *in vitro* com a expressão de moléculas de superfície, anulando a hipótese de que essa população é gerada diretamente na medula óssea. No nosso estudo vimos um aumento na expressão de CD66b nos LDNs gerados por estímulo com *M. leprae* em sangue total e notamos que o aumento dos LDNs CD66b⁺ é relacionado com o aumento na frequência total de LDNs. Visto que o CD66b é um marcador relacionado à atividade de degranulação de neutrófilos, esse dado mais uma vez indica a degranulação como fonte de geração de LDNs (Naegelen et al., 2015; Rocha et al., 2015).

Ao contrário do que foi mostrado em outros trabalhos nos quais os LDNs eram compostos por uma população mista, formada por células com morfologia imatura e madura (Denny et al., 2010; Sagiv et al., 2015), nos pacientes com ENH foi observado que os neutrófilos maduros segmentados são as células predominantes na constituição dos LDNs. Também podemos observar que grande parte dos LDNs de pacientes ENH possuíam núcleo hipersegmentado. Porém, ainda não se sabe se essa hipersegmentação implica em alguma mudança funcional, visto que ainda não existe um consenso que determine se os neutrófilos hipersegmentados são células mais velhas ou mais ativadas (Pillay et al., 2013).

Alguns trabalhos mostraram diferenças entre LDNs e HDNs por análises de microscopia eletrônica de transmissão (Carmona-Rivera & Kaplan, 2013; Sagiv et al., 2015). No nosso estudo também observamos diferenças morfológicas discretas entre LDNs e HDNs de pacientes ENH. Vimos que os LDNs apresentam projeções membranares e, de maneira qualitativa, vimos uma menor quantidade de grânulos no citoplasma dessas células, estando os grânulos mais evidentes nos HDNs. Esses achados, corroboram com nossa hipótese de maior ativação da subpopulação LDN nos pacientes ENH.

Embora não tenhamos observado diferença estatística nas análises dos marcadores de ativação de neutrófilos, os níveis elevados de CD11b, CD16 e CD66b em pacientes com ENH sugerem um perfil mais ativado. Em contrapartida, a expressão de CD62L se encontra diminuída nos pacientes ENH. Mais uma vez esse resultado corrobora com dados descritos na literatura que mostram que com o aumento na ativação dos neutrófilos, a expressão de CD62L é reduzida. LDNs morfolologicamente maduros, assim como o observado no nosso estudo, foram associados à infecção por *M. tuberculosis*. Nesse trabalho, foi visto que os LDNs possuíam expressão aumentada dos receptores CD15, CD16, CD66b e, uma ampliação na produção de ROS, porém com expressão de CD62L diminuída (Deng et al., 2016).

Esses resultados indicam o possível papel ativo dos LDNs no desenvolvimento e agravamento do ENH. É importante citar que a variabilidade entre os pacientes, assim como o pequeno tamanho amostral de determinados experimentos, afetaram as análises dos nossos resultados e não nos deixam concluir a significância de algumas observações.

Alguns trabalhos publicados nos anos 70 demonstraram através do teste do NBT “nitro blue tetrazolium” que neutrófilos de pacientes com ENH são mais ativados, produzindo mais compostos oxidativos (Goihman-Yahr et al., 1975). Além disso, foi visto que neutrófilos de indivíduos sadios estimulados com soro de pacientes ENH, foram capazes de se tornar mais ativados (Sher et al., 1978), indicando que fatores presentes no soro de pacientes com ENH estão envolvidos na ativação de neutrófilos. Recentemente, demonstramos que neutrófilos circulantes de pacientes ENH possuem níveis elevados de CD64 (Schmitz et al., 2016), um marcador de ativação de neutrófilos que favorece a adesão no endotélio (Fadlon et

al., 1998). No nosso trabalho, foi possível correlacionar expressão de CD64 em neutrófilos circulantes com número de nódulos na pele e a gravidade dos pacientes ENH (Schmitz et al., 2016).

No nosso estudo, não foi possível avaliar o perfil de neutrófilos N1 (pró-inflamatório/anti-tumoral) vs. N2 (anti-inflamatório/pró-tumoral) dos pacientes com hanseníase. Seria interessante avaliar se esta polarização é correlacionada com as formas polares da hanseníase, TT e LL, respectivamente. Estudos fenotípicos e funcionais poderiam confirmar essa hipótese. Entretanto, o aumento de CD49d nos LDNs dos pacientes multibacilares fortalece essa hipótese. Na literatura, foi descrita uma subpopulação de neutrófilos hipersegmentados apresentando fenótipo CD49⁺CXCR4^{hi}VEGFR1^{hi} em um modelo murino de tumor não vascularizado. Essa população apresentou capacidade aumentada de migração para os locais de hipóxia, além de liberação de proteases, favorecendo respostas proangiogênicas (Massena et al., 2015). Em conjunto, outros trabalhos apontam o potencial pró-angiogênico de neutrófilos N2, devido a produção elevada de MMP-9 e VEGF, moléculas estritamente relacionadas com angiogênese e revascularização tecidual, e evidenciam a sua capacidade invasiva e pró-tumoral/imunossupressora (Mantovani et al., 2011; Piccardi et al., 2012; Perobelli et al., 2015). Na hanseníase, foi demonstrado que o aumento da angiogênese na lesão está associada com o aumento da carga bacilar do paciente, seguindo a direção do polo lepromatoso do espectro hansênico (Bhandarkar et al., 2007). Os nossos resultados referentes aos níveis séricos de MMP-9 e da expressão de CD49d nos neutrófilos são fortes indícios de que os LDNs de pacientes multibacilares são pró-angiogênicos – N2, e que esse mecanismo de angiogênese participa da imunopatogenia do ENH.

A análise de pacientes com ENH no momento do diagnóstico clínico e 7 dias após o início do tratamento com talidomida revelou que o tratamento não inibiu a frequência de LDNs, sugerindo que o tratamento com talidomida não interfere em mecanismos associados à geração de LDNs. Entretanto, foi anteriormente descrito que 7 dias de tratamento com talidomida diminui a concentração de neutrófilos presentes nas lesões ENH (Schmitz et al., 2016; Mendes et al., 2017). Estudos *in vitro* revelaram que a talidomida diminui a expressão de E-selectina em células endoteliais (Lee et al., 2010), assim como a expressão de CD64 em neutrófilos circulantes de pacientes ENH (Schmitz et al., 2016). Em conjunto, esses achados *in*

vitro e *in vivo* revelam um possível modo de atuação da talidomida durante o tratamento de pacientes ENH, contribuindo para diminuição da migração de neutrófilos para as lesões de pele, conforme observado nesses pacientes.

A diminuição no estado de ativação dos LDNs de pacientes tratados com a talidomina pode ser um mecanismo relacionado à regressão no estado inflamatório sistêmico observado nesses pacientes. Nos LDNs de pacientes em tratamento com talidomida observamos uma redução significativa na expressão de CD11b e CD16. Nesse mesmo grupo notamos, embora não significativamente, que os níveis de CD62L foram restaurados, mostrando que apesar da talidomida não influenciar na frequência de LDNs na circulação, ela induz uma diminuição na ativação da célula e por consequência, uma diminuição da inflamação sistêmica.

Estudos anteriores mostraram a capacidade anti-inflamatória da talidomida no ENH. O efeito imunossupressor da talidomida foi relacionado com a supressão da produção de TNF *in vitro* por monócitos humanos estimulados com LPS via TLR4 (Sampaio et al., 1991). Em seguida, foi visto que a inibição de NF-κB e diminuição da meia vida do RNAm do TNF agem nesse mecanismo de supressão (Moreira et al., 1993). Também já foi descrito que o tratamento com talidomida leva a inibição da produção de IL-12 e IL-6 (Muller, 1997; Haslett et al., 1998; Millrine et al., 2016) e diminuição da expressão de CD64 em neutrófilos (Schmitz et al., 2016). Além disso, a talidomida inibiu a secreção de IL-8 e TNF em neutrófilos de pacientes BL/LL e ENH quando estimulados *in vitro* com LPS ou *M. leprae* (Oliveira et al., 1999). A talidomida também é utilizada no bloqueio da replicação do HIV (Makonkawkeyoon et al., 1993), na supressão da perda de peso relacionada a AIDS (Kaplan et al., 2000), favorece o ganho de peso em pacientes co-infectados com *M. Tuberculosis* - HIV-1 (Klausner et al., 1996), além de ser utilizada no tratamento de alguns tipos de câncer e em doença de Crohn (Vargesson, 2015). Além disso, é importante destacar que apesar dos possíveis efeitos adversos, a talidomida é uma ótima opção para o tratamento do ENH. Na Etiópia e nas Filipinas, países endêmicos para hanseníase e ENH, a talidomida não está disponível e seu uso é extremamente restrito no Nepal (Walker et al., 2015). Isso mostra o quão importante é a identificação de fontes alternativas de tratamento e possíveis biomarcadores de ENH.

Alguns estudos visam a identificação de fatores (epi)genéticos e/ou ambientais que poderiam ditar os diferentes desfechos durante a infecção pelo *M.*

leprae e que poderiam disparar sinais que levariam aos quadros reacionais. Os membros da família dos receptores do tipo toll (TLR) 1, 2 e 6 foram implicados no reconhecimento do *M. leprae* (Krutzik et al., 2003). De fato, o polimorfismo de TLR2 foi associado a ocorrência de RR (Bochud et al., 2008) e a ausência de TLR1 relacionado com a proteção da ocorrência dessa reação (Misch et al., 2008). Dias e col. (2016) demonstraram que TLR9 tinha expressão aumentada nas lesões ENH e em leucócitos circulantes (células B, monócitos e células dendríticas plasmacitóides) (Dias et al., 2016). Além disso, pacientes ENH possuem níveis elevados de ligantes de TLR9 (complexo DNA-histona humana e DNA-histona micobacteriana) na circulação quando comparados aos pacientes não reacionais (BL/LL) (Dias et al., 2016). PBMC de pacientes BL/LL com e sem ENH foram estimulados *in vitro* com *M. leprae* e secretaram altos níveis de TNF, IL-6 e IL-1 β e o antagonista sintético de TLR9 inibiu essa secreção. Recentemente, demonstramos que neutrófilos circulantes (isto é, HDN) de pacientes ENH também possuem níveis elevados de TLR9 (Silva, 2018). Com os nossos achados seria interessante estudar a relação dos LDNs e a via de TLR9 no contexto do ENH.

De acordo com a nossa busca na literatura, é a primeira vez que é descrita a presença de LDNs durante o ENH. Por outro lado, demonstramos evidências de que essas células podem ter origem na degranulação de neutrófilos circulantes de densidade normal e que antígenos do *M. leprae* possuem capacidade de induzir LDNs *in vitro*. Como demonstrado em outras doenças, LDNs descritos aqui neste trabalho possuem perfil ativado e foram correlacionados com a gravidade do ENH. Cabe destacar que o tratamento dos pacientes ENH com talidomida inibiu a expressão de moléculas de ativação nos LDNs sem alterar a frequência dessas células na circulação. Ainda não está claro, por exemplo, se LDNs de ENH apresentam mais propensão à liberar NETs como os LDNs vistos no lúpus (Garcia-Romo et al., 2011; Villanueva et al., 2011) e esse achado precisa ser determinado. Se os LDNs possuem capacidades imunoestimulatórias ainda precisa ser determinado, assim como a polarização N1 e N2 nas diferentes formas clínicas da hanseníase. Finalmente, as interações entre LDNs e outras células do sistema imune deve ser o foco de novas investigações. A determinação da origem e a patogenicidade de LDNs poderá ampliar as estratégias terapêuticas do ENH. Dessa forma, seremos capazes de ter um melhor entendimento sobre a infecção pelo *M.*

leprae e o desenvolvimento da hanseníase e evolução para o ENH. As nossas perspectivas futuras são avaliar a funcionalidade e os mecanismos de degranulação de neutrófilos na infecção pelo *M. leprae*.

6. CONCLUSÕES

De acordo com nossos dados, concluímos que LDNs estão presentes em níveis elevados no sangue periférico de pacientes com ENH e que o aumento dessa subpopulação está correlacionado com a gravidade do ENH. A hipersegmentação nuclear e o perfil de expressão dos marcadores de ativação analisados, sugerem que pacientes ENH possuem LDNs mais ativados em comparação à pacientes não reacionais. O tratamento com a talidomida não teve influência na frequência de LDNs circulantes em pacientes ENH. Contudo, o perfil de ativação dessas células foi reduzido, visto a diminuição na expressão de CD11b, CD16 e aumento de CD62L. Buscando entender a possível fonte de geração de LDNs nos pacientes com hanseníase, observamos um aumento nos níveis do marcador de degranulação MMP-9 no soro de pacientes MB sem e com ENH. Além disso, os níveis de MMP-9 séricos foram correlacionados com a frequência de LDNs circulantes. Por último, mostramos que a presença de antígenos de *M. leprae* é capaz de induzir geração de LDNs *in vitro* e a um aumento na expressão de CD66b na superfície dos LDNs. Nossos resultados indicam a degranulação como fonte de geração de LDNs em pacientes com hanseníase, e tal mecanismo favorece o agravamento do quadro clínico de ENH (Figura 6.1).

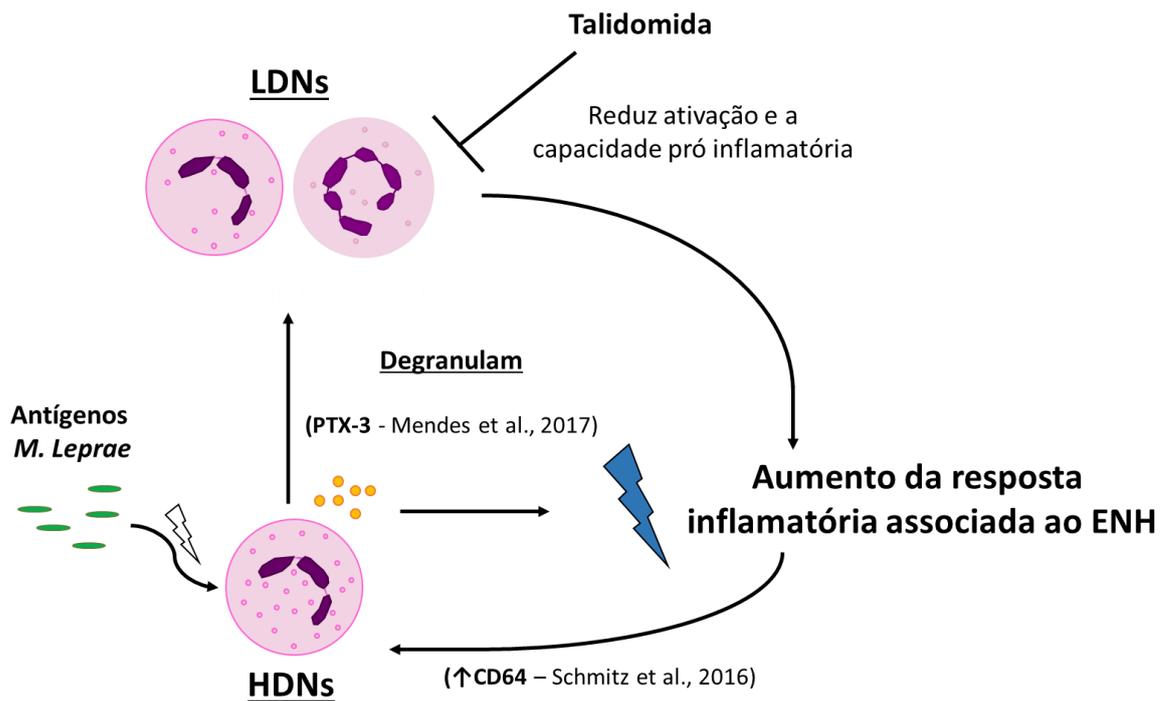


Figura 6.1: Proposta dos mecanismos envolvidos na geração de LDNs circulantes e seu papel no agravamento do ENH. A presença de antígenos de *M. leprae* na circulação, ativa HDNs circulantes que respondem à ativação degranulando com maior intensidade, gerando assim os LDNs ativados. Dessa forma, as proteínas degranuladas em conjunto com a presença elevada de LDNs na circulação, culminam no aumento da resposta inflamatória associada ao ENH. Visto o aumento na expressão de CD64 nos HDNs e nos níveis séricos de PTX-3 em pacientes ENH já publicados. A talidomida, por sua vez, age reduzindo a ativação e a capacidade pró-inflamatória dos LDNs.

7. REFERÊNCIAS

- Aarão TL, Esteves NR, Esteves N, Soares LP, Pinto Dda S, Fuzii HT, et al. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. *Microb Pathog* 2014; 77:66–72.
- Abdallah M, Attia EAS, Saad AA, El-Khateeb EA, Lotfi RA, Abdallah M, et al.: Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-regs cells. *Exp Dermatol* 2014; 23:742–747.
- Abebe T, Takele Y, Weldegebreal T, Cloke T, Closs E, et al. Arginase Activity - A Marker of Disease Status in Patients with Visceral Leishmaniasis in Ethiopia. *PLoS Negl Trop Dis* 2013; 7(3):e2134.
- Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, Barbosa MGM, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: a model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Rev Clin Immunol* 2015; 11:3.10.
- Anthony J, Vaidya MC, Dasgupta A. Ultrastructure of skin in erythema nodosum leprosum. *Cytobios* 1983; 36:17–23.
- Avanzi C, del-Pozo J, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, et al. Red squirrels in the British Isles are infected with leprosy bacilli. *Science* 2016; 354:744–747.
- Azulay RD. *Dermatologia*. Guanabara Koogan. 5ª edição. Rio de Janeiro, 2011.
- Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003; 197:711–23.
- Bhandarkar SS, Cohen C, Kuruvila M, Rea TH, MacKelfresh JB et al. Angiogenesis in cutaneous lesions of leprosy - implications for treatment. *Arch Dermatol* 2007; 143: 1527-1529.
- Bochud PY, Hawn TR, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, Abraham I, et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms are associated with reversal reaction in leprosy. *J Infect Dis* 2008; 197 (2):253–261.
- Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Monch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007; 28: 340–345.
- Bowers NL, Helton ES, Huijbregts RPH, Goepfert PA, Heath SL, Hel Z. Immune Suppression by Neutrophils in HIV-1 Infection: Role of PD-L1/PD-1 Pathway. *PLoS Pathog* 2014; 10(3): e1003993.

Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand, J Clin Lab* 1968; Invest. Suppl. 97:77–89.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004; 303:1532–1535.

Carmona-Rivera C, Kaplan MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. *Semin Immunopathol* 2013; 35(4):455-63.

Chowdhry S, Shukla A, D'souza P, Dhali T, Jaiswal P. Treatment of severe refractory erythema nodosum leprosum with tumor necrosis factor inhibitor etanercept, *Int J Mycobacteriol* 2016; 5:223–225.

Cloke T, Munder M, Taylor G, Müller I, Kropf P. Characterization of a novel population of low-density granulocytes associated with disease severity in HIV-1 infection. *PLoS ONE* 2012; 7:e48939.

Cocito C, Delville J. Biological, chemical, immunological and staining properties of bacteria isolated from tissues of leprosy patients. *Eur J Epidemiol* 1985; 1 (3):202-31.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001; 22:1007-1011.

Condamine T, Dominguez GA, Youn JI, Kossenkov AV, Mony S, Alicea-Torres K, et al. Lectin-type oxidized LDL receptor-1 distinguishes population of human polymorphonuclear myeloid-derived suppressor cells in cancer patients. *Sci Immunol*. 2016 Aug; 1(2): aaf8943.

Cowland JB, Borregaard N. Granulopoiesis and granules of human neutrophils. *Immunol Rev* 2016; 273:11–28.

Decoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62:2173–93.

Deng Y, Ye J, Luo Q, Huang Z, Peng Y, Xiong G, et al. Low-density granulocytes are elevated in mycobacterial infection and associated with the severity of tuberculosis. *PLoS ONE* 2016; 11:e0153567.

Deniset JF, Kubes P. Neutrophil heterogeneity: Bona fide subsets or polarization states?. *J Leukoc Biol* 2018;103:829–838.

Denny MF, Yalavarthi S, Zhao W, Thacker SG, Anderson M, Sandy AR, et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. *J Immunol* 2010; 184:3284–3297.

de Sousa JR, Sotto MN, Simões Quaresma JA. Leprosy As a Complex Infection: Breakdown of the Th1 and Th2 Immune Paradigm in the Immunopathogenesis of the Disease. *Front Immunol* 2017; 8:1635.

Dhainaut M, Moser M. Regulation of immune reactivity by intercellular transfer. *Front Immunol* 2014; 5:112.

Dias AA, Silva CO, Santos JPS, Batista-Silva LR, Acosta CCD, Fontes ANB, et al. DNA Sensing via TLR-9 Constitutes a Major Innate Immunity Pathway Activated during Erythema Nodosum Leprosum. *J Immunol*. 2016; 197(5): 1905–13.

Dumitru CA, Moses K, Trellakis S, Lang S, Brandau S. Neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: immunophenotyping, cell biology and clinical relevance in human oncology. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61(8):1155– 1167.

Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. *Actas Dermosifiliogr*. 2013; 104(7): 554-563.

Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis*. Review 2002; 28(2):260-74.

Faber WR, Jensema AJ, Goldschmidt WF. Treatment of recurrent erythema nodosum leprosum with infliximab. *N Engl J Med* 2006;355:739.

Fadlon E, Vordermeier S, Pearson TC, Mire-Sluis AR, Dumonde DC, Phillips J, et al. Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* 1998; 91 (1):266–74.

Fallows D, Peixoto B, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* alters classical activation of human monocytes in vitro. *J Inflamm* 2016; 13:8.

Fine, PEM. Reflections on the elimination of leprosy. *Int J Lep* 1992; 60 (1):71-80.

Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto, Hanseníase* 1997;30:355-339.

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L, et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta, “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* 2009; 16:183–194.

Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007; 176(2):231-41.

Gallin JI. Human neutrophil heterogeneity exists, but is it meaningful? *Blood* 1984; 63:977–983.

Gallo ME, Sampaio E, Nery JA, Moraes MO, Antunes SL, Pessolani MC. Hanseníase: aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos. In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora; 2005; p.1383-1394.

Garcia-Romo GS, Caielli S, Vega B, Connolly J, Allantaz F, Xu Z, et al. Netting neutrophils are major inducers of type I IFN production in pediatric systemic lupus erythematosus. *Sci Transl Med* 2011; 3:73ra20.

Geluk A. Correlates of immune exacerbations in leprosy. *Semin Immunol* 2018; 39:111-118.

Gohman-Yahr M, Rodriguez-Ochoa G, Aranzazu N, Convit J. Polymorphonuclear activation in leprosy. I. Spontaneous and endotoxin-stimulated reduction of nitroblue tetrazolium: effects of serum and plasma on endotoxin-induced activation. *Clin Exp Immunol* 1975; 20(2): 257–64.

Guerin E, Orabona M, Raquil MA, Giraudeau B, Bellier R, Gibot S, et al. Circulating immature granulocytes with T-cell killing functions predict sepsis deterioration. *Crit Care Med* 2014;42:2007–2018.

Hacbarth E, Kajdacsy-Balla A. Low density neutrophils in patients with systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and acute rheumatic fever. *Arthritis Rheum* 1986; 29:1334–1342.

Hall A. Conference scene: T-cell subset phenotype and function. *Immunotherapy* 2011; 3:719–21.

Hastings RC. MDT and transmission. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1998;66(2):224.

Herra CM, Keane CT, Whelan A. Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. *J Med Microbiol* 1996; 44 (2):135–40.

ILA (International Leprosy Association). Sixth International Congress of Leprosy. *Int J Lepr*. 1953; 21(4): 504-507.

Ito T, Schaller M, Hogaboam CM, Standiford TJ, Sandor M, Lukacs NW, et al. TLR-9 regulates the mycobacteria-elicited pulmonary granulomatous immune response in mice through DC-derived Notch ligand delta-like 4. *J Clin Invest* 2009; 119(1):33-46.

Jablonska J, Leschner S, Westphal K, Lienenklaus S, Weiss S. Neutrophils responsive to endogenous IFN-beta regulate tumor angiogenesis and growth in a mouse tumor model. *J Clin Invest* 2010; 120:1151–1164.

Job CK, Gude S, Macaden VP. Erythema Nodosum Leprosum. A Clinico-pathologic study. *Int J Lepr* 1964; 32:177-84.

Kahawita IP, Lockwood DN. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; 102(4):329-37.

Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy - *J Am Acad Dermatol*. 2014; 71: 795-803.

Kanamaru R, Ohzawa H, Miyato H, Matsumoto S, Haruta H, Kurashina K, et al. . Low density neutrophils (LDN) in postoperative abdominal cavity assist the peritoneal recurrence through the production of neutrophil extracellular traps (NETs). *Sci Rep* 2018; 8:632.

Kaufmann SH, Golecki JR, Kazda J, Steinhoff U. T lymphocytes, mononuclear phagocytes, Schwann cells and *Mycobacterium leprae*. *Acta Leprol* 1989; 7 Suppl 1:141–8.

Kaur I, Dogra S, Narang T, De D. Comparative efficacy of thalidomide and prednisolone in the treatment of moderate to severe erythema nodosum leprosum: a randomized study. *Austral J Dermatol* 2009; 50(3):181–5.

Keskinov AA, Shurin MR. Myeloid regulatory cells in tumor spreading and metastasis. *Immunobiology* 2015; 220, 236–242..

Klausner JD, Makonkawkeyoon S, Akarasewi P, Nakata K, Kasinrerak W, Corral L, et al. The effect of thalidomide on the pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1 and *M. tuberculosis* infection. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1996; 11 (3):247-57

Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature Rev Immunol* 2013; 13:159—175.

Kruger P, Saffarzadeh M, Weber AN, Rieber N, Radsak M, von Bernuth H, et al. Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury. *PLoS Pathog* 2015; 11(3):e1004651.

Krutzik SR, Ochoa MT, Sieling PA, Uematsu, Ng YW, Legaspi A, et al. Activation and regulation of Toll-likereceptors 2 and 1 in human leprosy. *Nat Med* 2003; 9 (5):525–532.

Lacy P. Mechanisms of degranulation in neutrophils. *Allergy Asthma Clin Immun* 2006; 2:98-108.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol* 2005; 54(3):235.

Lang S, Bruderek K, Kaspar C, Hoing B, Kanaan O, Dominas N et al. Clinical relevance and suppressive capacity of human MDSC subsets. *Clin Cancer Res* 2018; 24:4834–4844.

Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, et al. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis* 2010; 201(4):558-69.

Liu Y, Hu Y, Gu F, Liang J, Zeng Y, Hong X, et al. Phenotypic and clinical characterization of low density neutrophils in patients with advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2017; 8:90969-90978.

Lloyd GM, Draper P. Separation of *Mycobacterium leprae* from contamination with armadillo-liver-derived "pigment" particles. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1986; 54(4):578-83.

Lockwood DN, Vinayakumar S, Stanley JN, McAdam KP, Colston MJ. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad, India. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1993; 61:8-15.

Luckner-Minden C, Fischer I, Langhans CD, Schiller M, Kropf P, Muller I, et al. Human eosinophil granulocytes do not express the enzyme arginase. *J Leukoc Biol* 2010; 87(6):1125–1132.

Mabalay MC, Helwig EB, Tolentino JG, Binford CH. The Histopathology and histochemistry of erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr* 1965; 33:28-49.

Makonkawkeyoon S, Limson-Pobre RN, Moreira AL, Schauf V, Kaplan G. Thalidomide inhibits the replication of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci* 1993;90 (13):5974-8.

Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1999; 67(3):270-8.

Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:519–31.

Martinez TS, Figueira MM, Costa AV, Gonçalves MA, Goulart LR, Goulart IM. Oral mucosa as a source of *Mycobacterium leprae* infection and transmission, and implications of bacterial DNA detection and the immunological status. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17(11):1653-8.

Martinez AN, Lahiri R, Pittman TL, Scollard D, Truman R, Moraes MO. Molecular determination of *Mycobacterium leprae* viability by use of real-time PCR. *J Clin Microbiol* 2009; 47(7):2124.

Massena S, Christoffersson G, Vågesjö E, Seignez C, Gustafsson K, Binet F, et al. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood* 2015; 126:2016–2026.

Mayadas TN, Cullere X, Lowell CA. The multifaceted functions of neutrophils. *Annu Rev Pathol* 2014; 9:181–218.

Mishalian I, Granot Z, Fridlender ZG. The diversity of circulating neutrophils in cancer. *Immunobiol* 2017; 222:82–88.

Mencacci A, Montagnoli C, Bacci A, Cenci E, Pitzurra L, Spreca A, et al. CD80 β Gr-1 β myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis. *J Immunol* 2002; 169:3180–3190.

Mendes MA, de Carvalho DS, Amadeu TP, Silva BJA, Prata RBDS, da Silva CO, et al. Elevated Pentraxin-3 Concentrations in Patients With Leprosy: Potential Biomarker of Erythema Nodosum Leprosum. *J Infect Dis* 2017; 216(12):1635-1643.

Mercer F, Ng SH, Brown TM, Boatman G, Johnson PJ. Neutrophils kill the parasite *Trichomonas vaginalis* using trogocytosis. *PLoS Biol* 2018; 16(2):e2003885.

Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity. *Blood*. 2011; 117(3):953-9.

Millrine D, Miyata H, Tei M, Dubey P, Nyati K, Nakahama T, et al. Immunomodulatory drugs inhibit TLR4-induced type-1 interferon production independently of Cereblon via suppression of the TRIF/IRF3 pathway. *Int Immunol* 2016; 28(6):307-15.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de procedimentos técnicos: baciloscopia em hanseníase / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Brasília. Editora do Ministério da Saúde, 2010;

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Guia prático sobre a hanseníase [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017;

Misch EA, Macdonald M, Ranjit C, Sapkota BR, Wells RD, Siddiqui MR, et al. Human TLR1 deficiency is associated with impaired mycobacterial signaling and protection from leprosy reversal reaction. *PLoS Negl Trop Dis* 2008; 2 (5):e231.

Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborcht PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006; 77(3):189-202.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* 1999; 50.

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *J Exp Med* 1993; 177:1675–1680.

Morisaki T, Goya T, Ishimitsu T, Torisu M. The increase of low density subpopulations and CD10 (CALLA) negative neutrophils in severely infected patients. *Surg Today* 1992; 22:322–327.

Muller GW. Thalidomide From tragedy to new drug discovery. *Chemtech* 1997; 27 (1): 21-25.

Murphy GF, Sanchez NP, Flynn TC, Sanchez JL, Mihm MC, Soter NA: Erythema nodosum leprosum: nature and extent of the cutaneous microvascular alterations. *J Am Acad Dermatol* 1986; 14:59–69.

Naegelen I, Beaume N, Plancon S, Schenten V, Tschirhart EJ, Brechard J. Regulation of neutrophil degranulation and cytokine secretion: a novel model approach based on linear fitting. *J Immunol Res* 2015; 2015:817038.

Nagaraj, S., Schrum, A. G., Cho, H. I., Celis, E., and Gabrilovich, D. Mechanism of T cell tolerance induced by myeloid-derived suppressor cells. *J Immunol* 2010; 184:3106–3116.

Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Jain S, Brooks P, Colston MJ, et al. The effect of antigen presenting cells on the cytokine profiles of stable and reactional lepromatous leprosy patients. *Immunol Lett* 2000; 75:69–76.

Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nat Immunol* 2014; 15:602–611.

Nery JA, Vieira LM, de Matos HJ, Gallo ME, Sarno EN. Reactional states in multibacillary Hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998 Nov-Dez; 40 (6):363-70.

Nery JA., Duppre NC., Salles AM., Jardim M., Illarramendi X., Machado AM. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais. Uma abordagem prática. *Na Bras Dermatol* 2006; 81:p.367-375.

Nobre ML, Illarramendi X, Dupnik KM, Hacker MA, Nery JAC, Jeronimo SMB, et al. Multibacillary leprosy by population groups in Brazil: Lessons from an observational study. *PLoS Negl Trop Dis* 2017; 11 (2):e0005364.

Oliveira RB, Moraes MO, Oliveira EB, Sarno EN, Nery JA, Sampaio EP. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J Leukoc Biol* 1999; 65(3):364-71.

Oliveira Fulco T, Andrade PR, de Mattos Barbosa MG, Pinto TG, Ferreira PF, Ferreira H, et al. Effect of apoptotic cell recognition on macrophage polarization and mycobacterial persistence. *Infect Immun* 2014; 82:3968-78.

Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2010; 191:677-691.

Patera AC, Drewry AM, Chang K, Beiter ER, Osborne D, Hotchkiss RS. Frontline science: defects in immune function in patients with sepsis are associated with PD-1 or PD-L1 expression and can be restored by antibodies targeting PD-1 or PD-L1. *J Leukoc Biol* 2016; 100:1239-54.

Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, Dolcetti L, Zanovello P, Mandruzzato S, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition. *Curr Opin Immunol* 2010; 22:238-244.

Perobelli SM, Galvani RG, Goncalves-Silva T, Xavier CR, Nobrega A, Bonomo A. Plasticity of neutrophils reveals modulatory capacity. *Braz J Med Biol Res* 2015;48:665-75.

Piccard H, Muschel RJ, Opdenakker G. On the dual roles and polarized phenotypes of neutrophils in tumor development and progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2012;82:296-309.

Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JAM, et al. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 2010; 116(4):625-627.

Pillay J, Tak T, Kamp VM, Koenderman L. Immune suppression by neutrophils and granulocytic myeloid-derived suppressor cells: similarities and differences. *Cell. Mol. Life Sci* 2013; 70:3813-3827.

Pinheiro RO, de Souza Salles J, Sarno EN, Sampaio EP. Mycobacterium leprae-host-cell interactions and genetic determinants in leprosy: an overview. *Future Microbiol* 2011;6:217-230.

Podolska MJ, Biermann MH, Maueroder C, Hahn J, Herrmann M. Inflammatory etiopathogenesis of systemic lupus erythematosus: an update. *J Inflamm Res* 2015; 8:161-71.

Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN. A systematic review of immunological studies of erythema nodosum leprosum. *Front Immunol* 2017; 8:233.

Ramien ML, Wong A, Keystone JS. Severe refractory erythema nodosum successfully treated with the tumor necrosis factor inhibitor etanercept. *Clin Infect Dis* 2011;52:e133-5.

Ress RFW. The microbiology of leprosy; in *Leprosy* (ed.) R C Hastings (London: Churchill Livingstone) pp 31-52. 1985.

Rees RFW, Yong DB. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC. *Leprosy*. 2th Edinbuhg: Churchil Livingstone; 1994; p. 49-83;

Riedel DD, Kaufmann SH. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immunol* 1997; 65:4620–4623.

Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev* 1962; 33:119–128.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity. A five-group system. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc* 1966; 34:255–273.

Raber PL, Thevenot P, Sierra R, Wyczechowska D, Halle D, Ramirez ME, et al. Subpopulations of myeloid-derived suppressor cells impair T cell responses through independent nitric oxide-related pathways. *Int J Cancer* 2014; 134:2853–2864.

Reyes-Teran G, Sierra-Madero JG, Martínez del Cerro V, Arroyo-Figueroa H, Pasquetti A, Calva JJ, et al. Effects of thalidomide on HIV-associated wasting syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *AIDS* 1996;10 (13):1501-7.

Rocha BC, Marques PE, Leoratti FM, Junqueira C, Pereira DB, Antonelli LR, et al. Type I interferon transcriptional signature in neutrophils and low-density granulocytes are associated with tissue damage in malaria. *Cell Rep* 2015; 13:2829–2841.

Rodriguez PC, Ernstoff MS, Hernandez C, Atkins M, Zabaleta J, Sierra R, et al. Arginase I-producing myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma are a subpopulation of activated granulocytes. *Cancer Res* 2009;69(4):1553–1560.

Rosales C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Front Physiol* 2018; 9:113.

Sagiv JY, Michaeli J, Assi S, Mishalian I, Kisos H, Levy L, et al. Phenotypic diversity and plasticity in circulating neutrophil subpopulations in cancer. *Cell Rep* 2015; 10: 562–573.

Sadik CD, Kim ND, Luster AD. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol* 2011; 32 (10):452–460.

Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med* 1991; 173:699–703.

Santos JR, Vendramini DL, Nery JA, Avelleira JC. Etanercept in erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol* 2017; 92(4):575-577.

Sarita S, Muhammed K, Najeeba R, Rajan GN, Anza K, Binitha MP, et al. A study on histological features of lepra reactions in patients attending the Dermatology Department of the Government Medical College, Calicut, Kerala, India. *Lepr Rev* 2013; 84:51-64.

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:103–108.

Sarno EN, Sampaio EP. The role of inflammatory cytokines in the tissue injury of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1996; 64(4 Suppl):S69-73; discussion S73-4

Scapini P, Laudanna C, Pinardi C, Allavena P, Mantovani A, Sozzani A, et al. Neutrophils produce biologically active macrophage inflammatory protein-3alpha (MIP-3alpha)/CCL20 and MIP-3beta/CCL19. *Eur J Immunol* 2001; 31:1981–1988.

Scapini P, Cassatella MA. Social networking of human neutrophils within the immune system. *Blood* 2014; 124 (5):710-719.

Schmitz V, Prata RBS, Barbosa MGM, Mendes MA, Brandão SS, Amadeu TP, et al. Expression of CD64 on circulating neutrophils favoring systemic inflammatory status in Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis* 2016; 10 (8): e0004955.

Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19(2):338-81.

Selders GS, Fetz AE, Radic MZ, Bowlin GL. An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration. *Regener Biomaterials* 2017;4:55–68.

Shaul ME, Levy L, Sun J, Mishalian I, Singhal S, Kapoor V, et al. Tumor-associated neutrophils display a distinct N1 profile following TGFbeta modulation: A transcriptomics analysis of pro- vs. antitumor TANs. *Oncol Immunol* 2016; 5(11):p. e1232221.

Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med.* 1960;112(3):445-54

Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr* 1962; Sep:291–306.

Sher R, Anderson R, Glover A, Wadee AA. Polymorphonuclear cell function in the various polar types of leprosy and erythema nodosum leprosum. *Infect Immunol* 1978; 21(3):959–65.

Sheshachalam A, Srivastava N, Mitchell T, Lacy P, Eitzen G. Granule protein processing and regulated secretion in neutrophils. *Front Immunol* 2014; 5:448.

Silva CO. Envolvimento da NETose na imunopatogênese do Eritema Nodoso Hanseniano. Rio de Janeiro. Dissertação [Mestrado em Biologia Celular e Molecular]. Instituto Oswaldo Cruz; 2018.

Sinan/Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. Indicadores epidemiológicos e operacionais de hanseníase Brasil 2001–2017. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/13/Indicadoresepidemiologicos-e-operacionais-de-hanseniase-Brasil-2001-a-2017.pdf>

Sionov RV, Assi S, Gershkovitz M, Sagiv JY, Polyansky L, Mishalian I, Fridlender ZG, Granot Z. Isolation and characterization of neutrophils with anti-tumor properties. *J Vis Exp* 2015; 100:e52933.

Song SH, Kim HK, Park MH, Cho HI. Neutrophil CD64 expression is associated with severity and prognosis of disseminated intravascular coagulation. *Thromb Res* 2008; 121 (4):499–507.

Spellberg B, Edwards JE. Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin Infect Dis* 2001; 32:76-102.

Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev* 2011; 82(4):344-57.

Ssemaganda A, Kindinger L, Bergin P, Nielsen L, Mpendo J, Ssetaala A, et al. Characterization of neutrophil subsets in healthy human pregnancies. *PLoS ONE* 2014; 9:e85696.

Steele S, Radlinski L, Taft-Benz S, Brunton J, Kawula TH. Trogocytosis-associated cell to cell spread of intracellular bacterial pathogens. *Elife* 2016; 23:5:e10625.

Suneetha S, Arunthathi S, Job A, Date A, Kurian N, Chacko CJ. Histological studies in primary neuritic leprosy: changes in the nasal mucosa. *Lepr Rev* 1998; 69 (4):358-66.

Tecchio C, Micheletti A, Cassatella MA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. *Front Immunol* 2014; 5:508.

Tecchio C, Cassatella MA. Neutrophil-derived chemokines on the road to immunity. *Semin Immunol* 2016; 28 (2):119-128.

Teles RM, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonca-Lima L, Ferreira H, et al. High matrix metalloproteinase production correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun* 2010; 78(3):1012–1021.

Tosello BJ, Amezcua MC, Bermejo DA, Ramello MC, Montes CL, Cejas H, et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathog* 2012; 8:e1002658.

Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2001; 69(1):1-12.

Truman RW, Shannon EJ, Hagstad HV, Hugh-Jones ME, Wolff A, Hastings RC. Evaluation of the origin of *Mycobacterium leprae* infections in the wild armadillo, *Dasypus novemcinctus*. *Am J Trop Med Hyg* 1986;35:588–93.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med*. 2011;364:1626–33.

Tsuda Y, Takahashi H, Kobayashi M, Hanafusa T, Herndon DN, Suzuki F. Three different neutrophil subsets exhibited in mice with different susceptibilities to infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Immunity* 2004; 21:215–226.

Valentijn RM, Faber WR, Lai AFRF, Chan Pin Jie JC, Daha MR, van Es LA. Immune complexes in leprosy patients from an endemic and a nonendemic area and a longitudinal study of the relationship between complement breakdown products and the clinical activity of erythema nodosum leprosum. *Clin Immunol Immunopathol* 1982; 22 (2):194–202.

Varga G, Balkow S, Wild MK, Stadtbauer A, Krummen M, Rothoef T, et al. Active MAC-1 (CD11b/CD18) on DCs inhibits full T-cell activation. *Blood* 2007; 109(2):661–669.

Villanueva E, Yalavarthi S, Berthier CC, Hodgins JB, Khandpur R, Lin AM, et al. Netting neutrophils induce endothelial damage, infiltrate tissues, and expose immunostimulatory molecules in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 2011; 187(1):538-52.

Wade HW. Demonstration of acid-fast bacilli in tissue sections. *Am J Pathol* 1952; 28 (1):157-70.

Walker SL, Balagon M, Darlong J, Doni SN, Hagge DA, Halwai V, et al. ENLIST 1: An International Multi-centre Cross-sectional Study of the Clinical Features of Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis* 2015; 9(9):e0004065.

Walker SL, Waters MF, Lockwood DN. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev* 2007; 78(3):197–215.

Walsh GP, Meyers WM, Binford CH. Naturally acquired leprosy in the nine-banded armadillo: a decade of experience 1975–1985. *J Leukoc Biol* 1986;40:645–56.

Wang L, Chang EW, Wong SC, Ong SM, Chong DQ, Ling KL. Increased myeloid-derived suppressor cells in gastric cancer correlate with cancer stage and plasma S100A8/A9 proinflammatory proteins. *J Immunol* 2013; 190:794–804.

Wemambu SN, Turk JL, Waters MF, Rees RJ. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. *Lancet*. 1969; 1.2(7627):933-5.

Winterbourn CC, Kettle AJ, Hampton MB. Reactive Oxygen Species and Neutrophil Function. *Annu Rev Biochem* 2016; 85:765–792.

WHO/World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes: report of a WHO study group. 1982;<http://www.who.int/iris/handle/10665/38984>.

WHO/World Health Organization. Expert Committee on Leprosy: seventh report 1998; <http://www.who.int/iris/handle/10665/42060>.

WHO/World Health Organization. Leprosy: The disease 2012; <http://www.who.int>.

WHO/World Health Organization - Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. *Weekly Epidemiological Record* 2018; 35; 93:444–456 <http://www.who.int/wer>

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254(5029):277-9.

Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 1992;149 (4):1470–1475.

Youn JI, Collazo M, Shalova IN, Biswas SK, Gabrilovich DI. Characterization of the nature of granulocytic myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Leukoc Biol* 2012; 91:167–181.

Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, et al. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res* 2005; 65(8):3044–3048.

Zhang J, Xu X, Shi M, Chen Y, Yu D, Zhao C, et al. CD13hi Neutrophil-like myeloid-derived suppressor cells exert immune suppression through Arginase 1 expression in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncoimmunol* 2017;6:e1258504.

8. ANEXOS

8.1 Ficha da escala de severidade

ITEM	Edema periférico	Extensão das lesões cutâneas	Número de lesões cutâneas ENH	Febre	Sinais sistêmicos: Mal estar Cefaléia Queixas nasais Queixas visuais Mialgia Dor testicular Dor óssea Dor neural Alteração de sensibilidade Fraqueza muscular Perda de peso Artralgia Parestesia Adenomegalia
0	Ausente	0	0	Ausente 37.5° C ou <	Ausente
1	1 sítio nas mãos ou pé ou face	1-2 regiões	1-10	Sem febre no momento, mas relata febre nos últimos 7 dias	1
2	2 sítios	3-4 regiões	11-20	37.6-38.5° C	2
3	Todos os 3 sítios (mãos, pés e face)	5-7 regiões	21 ou >	38.6° C ou >	3 ou >
ESCORE					