

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

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

Avaliação da IL-33 no mecanismo de inflamação induzido pelo *Mycobacterium
leprae*: possíveis implicações na regulação das respostas imune inata e
adaptativa

JÉSSICA BRANDÃO DOS SANTOS

Rio de Janeiro
Agosto de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Jéssica Brandão dos Santos

Avaliação da IL-33 no mecanismo de inflamação induzido pelo *Mycobacterium leprae*: possíveis implicações na regulação das respostas imune inata e adaptativa

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Euzenir Nunes Sarno

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2019

Brandão dos Santos, Jéssica.

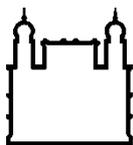
Avaliação da IL-33 no mecanismo de inflamação induzido pelo *Mycobacterium leprae* : possíveis implicações na regulação das respostas imune inata e adaptativa / Jéssica Brandão dos Santos. - Rio de Janeiro, 2019. 89 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Euzenir Nunes Sarno.

Bibliografia: f. 58-72

1. Hanseníase. 2. Interleucina - 33. 3. Neutrófilos. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: JÉSSICA BRANDÃO DOS SANTOS

Avaliação da IL-33 no mecanismo de inflamação induzido pelo *Mycobacterium leprae*: possíveis implicações na regulação das respostas imune inata e adaptativa

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Euzenir Nunes Sarno

Aprovada em: 26 / 08 / 2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Maria Cristina Vidal Pessolani - Presidente (IOC/ Fiocruz)

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

Prof. Dr. Luciana Silva Rodrigues (Faculdade de Ciências Médicas/Uerj)

Prof. Dr. Juliana Echevarria Neves de Lima (UFRJ/RJ)

Prof. Dr. Letícia Miranda Lery Santos (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 26 de agosto de 2019.

AGRADECIMENTOS

Eu gostaria de agradecer, primeiramente a Deus por ter estado ao meu lado e jamais ter me deixado desistir.

Aos meus pais, Eunice e José e toda a minha família, por sempre acreditarem em mim, principalmente minha mãe que embora não esteja mais presente, sempre viverá dentro de mim. Vocês me inspiram todos os dias para ser uma pessoa melhor.

Ao meu marido Cristiano, por estar ao meu lado em todos os momentos demonstrando imenso companheirismo, mesmo nas noites mal dormidas ouvindo minhas apresentações.

À minha orientadora, Dr^a Euzenir Nunes Sarno por ser um exemplo de mulher e cientista. Tenho um imenso orgulho em fazer parte deste grupo de pesquisa.

À Dr^a Verônica Schmitz, que embora não seja oficialmente minha orientadora, tem me orientado desde a iniciação científica. Muito obrigada pela paciência, carinho, dedicação e principalmente por me manter sempre com os pés no chão.

A todos os integrantes do laboratório de Hanseníase que de alguma forma contribuíram para a elaboração desse trabalho, principalmente ao Dr Milton Osório, chefe do laboratório, pelo apoio.

A Dr^a Roberta Olmo e a Dr^a Rhana Prata pela ajuda com os resultados da IL-33, todas as discussões no clube de revista e principalmente por sempre se mostrarem dispostas a ajudar.

Aos médicos e enfermeiros do Ambulatório Souza Araújo, sem a colaboração deles esse trabalho seria inviável.

Às minhas queridas amigas, Fabiana Pacheco, Isabella Forasteiro e Thaís Fernanda por todo apoio e companheirismo durante o mestrado, pelas risadas, discussões e ajudas prestadas sempre que necessário.

Ao Dr. Sérgio Augusto Lopes de Souza da Universidade Federal do Rio de Janeiro por se mostrar sempre disposto a ajudar.

A Thabata Leal e a Mayara Mendes por toda ajuda com o western blotting e o PCR.

A todos os funcionários do pavilhão da Hanseníase.

A rede de plataformas de Citometria da Fiocruz e a Dr^a Mariana Gandini.

Aos docentes e colaboradores do programa de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, cada aula ou palestra, não só aumentou meus conhecimentos gerais, como também aumentou meu senso crítico!

Aos integrantes da banca por terem aceitado de bom grado participarem da avaliação desse trabalho.

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.

Aos pacientes com hanseníase e os doadores sadios que participaram do nosso estudo.

“Algo só é impossível até que alguém duvide e acabe provando o
contrário.”

Albert Einstein



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Avaliação da IL-33 no mecanismo de inflamação induzido pelo *Mycobacterium leprae*: possíveis implicações na regulação das respostas imune inata e adaptativa

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Jéssica Brandão dos Santos

A IL-33 é uma citocina produzida por células endoteliais e epiteliais após danos que levam ao processo de necrose e vem sendo sugerida como uma alarmina tecidual. Os efeitos biológicos da IL-33 são mediados pelo seu receptor ST-2 presente na superfície de diversos tipos celulares como leucócitos, assim como a forma solúvel (sST-2) que pode regular os níveis de IL-33 livre no sangue. A IL-33 atua na polarização de respostas do tipo 2 e na migração de neutrófilos, regulando os níveis de CXCR2. Um dos aspectos mais intrigantes da hanseníase é a variedade de manifestações clínicas apresentadas pelos pacientes. O tipo de forma clínica apresentada é diretamente correlacionado com a resposta imune celular. A relação entre os níveis de IL-33 e as diferentes formas clínicas da hanseníase nunca foi investigada. Nosso objetivo geral foi investigar mecanismos moleculares envolvidos no recrutamento e polarização de neutrófilos durante a hanseníase e os objetivos específicos foram: (1) avaliar os níveis séricos de IL-33, (2) e sST-2 em pacientes com hanseníase, (3) correlacionar os níveis séricos de IL-33 com sST2, (4) Avaliar a produção de IL-33 e ST-2 em lesões de pele de pacientes com hanseníase, (5) avaliar a expressão de CD11b, CD62L, CD49d e CXCR2 em neutrófilos circulantes de pacientes com hanseníase e (6) avaliar a expressão de IL-8 em lesões de pele de pacientes durante o ENH e após 7 dias do início de tratamento com Talidomida. Para atingir os nossos objetivos, pacientes com hanseníase foram classificados clinicamente segundo critérios de Ridley e Jopling 1966 e agrupados da seguinte forma: (i) pacientes paucibacilares/PB (TT e BT), (ii) multibacilares/MB (BL e LL), (iii) pacientes com reação do tipo 1 (RR) e (iv) pacientes com reação do tipo 2 (ENH). Soro, lesões de pele e neutrófilos circulantes foram utilizados neste estudo. As proteínas IL-33 e sST-2 foram analisadas por ELISA e *western blotting* em amostras de soro e pele, respectivamente. O perfil fenotípico de neutrófilos foi avaliado por citometria de fluxo multiparamétrica utilizando-se anticorpos contra os alvos descritos no objetivo 5. Análises dos níveis proteicos de IL-33 e ST-2 em lesões de pele revelaram que pacientes MB possuem níveis aumentados tanto de IL-33 quanto de ST-2 quando comparados com pacientes PB. Além disso, pacientes MB exibiram níveis séricos elevados de IL-33 quando comparados com PB e esse achado foi correlacionado com o índice baciloscópico. Durante os episódios reacionais, os níveis de IL-33 permaneceram elevados em ENH, entretanto pacientes RR apresentaram níveis baixos. Os níveis séricos de sST-2 não foram alterados entre os diferentes grupos, porém a razão IL-33:sST-2 revelou que pacientes MB e ENH possuem níveis mais altos de IL-33 livre. Houve aumento da expressão de CD11b em neutrófilos de pacientes PB quando comparados aos neutrófilos de pacientes MB, revelando um perfil de ativação maior nos pacientes PB. Em contraste, neutrófilos MB apresentaram aumento na expressão de CD62L e CD49d quando comparados com neutrófilos PB, sugerindo que neutrófilos MB possam contribuir na angiogênese e estariam aptos para migrarem para o tecido durante o aparecimento súbito do quadro de ENH. Não houve diferença na expressão de CXCR2 quando comparamos neutrófilos PB versus MB, podendo justificar a ausência de neutrófilos em lesões de pele PB ou MB. Entretanto, neutrófilos circulantes de pacientes ENH apresentam baixos níveis de CD62L, CD49d e CXCR2 quando comparados com pacientes MB, sugerindo que estas moléculas podem ser importantes para o recrutamento de neutrófilos para lesões de pele, uma vez que a presença de neutrófilos em lesões ENH é um marco histológico específico dessa condição. Em conjunto, os nossos resultados contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na imunopatogênese da hanseníase.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Evaluation of IL-33 in inflammation induced by *Mycobacterium leprae*: possible implications in the regulation of innate and adaptative immunity

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Jéssica Brandão dos Santos

IL-33 is a cytokine produced by endothelial and epithelial cells following damage leading to the necrosis process and has been suggested as a tissue alarmin. The biological effects of IL-33 are mediated by its surface receptor ST-2 on various cell types such as leukocytes, as well as the soluble form (sST-2) that can regulate free IL-33 levels in the blood. IL-33 acts on the polarization of type 2 responses and neutrophil migration by regulating CXCR2 levels. One of the most intriguing aspects of leprosy is the variety of clinical manifestations presented by patients. The type of clinical form presented is directly correlated with the cellular immune response. The relationship between IL-33 levels and the different clinical forms of leprosy has never been investigated. Our overall objective was to investigate molecular mechanisms involved in neutrophil recruitment and polarization during leprosy and the specific objectives were: (1) to evaluate serum levels of IL-33, (2) and sST-2 in leprosy patients, (3) correlate serum levels of IL-33 with sST-2, (4) evaluate IL-33 and ST-2 production in skin lesions of leprosy patients, (5) evaluate CD11b, CD62L, CD49d and CXCR2 expression in neutrophils studies of leprosy patients and (6) to evaluate IL-8 expression in skin lesions of patients during ENL and 7 days after initiation of Thalidomide treatment. To achieve our goals, leprosy patients were clinically classified according to Ridley and Jopling 1966 criteria and grouped as follows: (i) paucibacillary / PB (TT and BT) patients, (ii) multibacillary / MB (BL and LL), (iii) patients with type 1 reaction (RR) and (iv) patients with type 2 reaction (ENL). Serum, skin lesions and circulating neutrophils were used in this study. IL-33 and sST-2 proteins were analyzed by ELISA and western blotting in serum and skin samples, respectively. The phenotypic profile of neutrophils was assessed by multiparametric flow cytometry using antibodies against the targets described in objective 5. Analysis of IL-33 and ST-2 protein levels in skin lesions revealed that MB patients have increased levels of both IL-33 as much as ST-2 when compared with PB patients. In addition, MB patients exhibited elevated serum IL-33 levels compared with PB, and this finding correlated with the bacilloscopic index. During the reaction episodes, IL-33 levels remained elevated in ENL, however RR patients had low levels. Serum sST-2 levels did not change between different groups, but the IL-33: sST-2 ratio revealed that MB and ENL patients have higher levels of free IL-33. There was an increase in CD11b expression in neutrophils from PB patients compared to neutrophils from MB patients, revealing a higher activation profile in PB patients. In contrast, MB neutrophils showed increased CD62L and CD49d expression when compared to PB neutrophils, suggesting that MB neutrophils may contribute to angiogenesis and would be able to migrate to tissue during the sudden onset of ENL. There was no difference in CXCR2 expression when comparing PB versus MB neutrophils, which may justify the absence of neutrophils in PB or MB skin lesions. However, circulating neutrophils from ENL patients have lower levels of CD62L, CD49d, and CXCR2 compared to MB patients, suggesting that these molecules may be important for neutrophil recruitment for skin lesions, as the presence of neutrophils in ENH lesions is a specific histological hallmark of this condition. Together, our results contribute to a better understanding of the cellular and molecular mechanisms involved in leprosy pathogenesis.

ÍNDICE

Resumo.....	viii
Abstract.....	ix
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xiv
Lista de Abreviaturas	xv

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase	1
1.1.1 Aspectos gerais da hanseníase	1
1.1.2. Epidemiologia	1
1.1.3 Agente etiológico	4
1.1.4 Aspectos clínicos gerais.....	6
1.1.5 Classificação e Espectro de formas clínicas	7
1.1.6 Episódios reacionais.....	12
1.1.7 Desenvolvimento da resposta imunológica contra <i>M. leprae</i>	14
1.2 Interleucina – 33.....	20
1.2.1 Caracterização.....	20
1.2.2 Polarização de respostas imunológicas.....	22

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho experimental, população de estudo e considerações éticas.....	25
3.2 Coleta e Processamento de Sangue.....	26
3.3 Dosagem de IL-33 e sST2.....	27
3.4 Purificação de neutrófilos de sangue periférico.....	27
3.5 Citometria de fluxo multiparamétrica.....	28
3.6 Avaliação do grau de pureza das preparações de neutrófilos.....	28
3.7 Extração de RNA e RTqPCR.....	29
3.8 Extração e quantificação de proteínas de biópsias de pele.....	30
3.9 Western Blotting.....	31
3.10 Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS	
4.1 Detecção de níveis séricos de IL-33 em pacientes com hanseníase.....	33
4.2 Expressão de ST-2 em biópsias de pele de pacientes com hanseníase.....	37
4.3 Detecção de níveis séricos de sST2 em pacientes com hanseníase.....	39
4.4 Avaliação fenotípica de neutrófilos circulantes de pacientes com hanseníase.....	40
5. DISCUSSÃO.....	50
6. CONCLUSÃO.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58

Lista de figuras

Figura 1.1.2-1 Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2017.....	3
Figura 1.1.3-1 Fotomicrografia de <i>M. leprae</i> na lesão de pele de paciente multibacilar.....	5
Figura 1.1.5-1 Representação esquemática da classificação de formas clínicas da hanseníase.....	10
Figura 1.1.7-1 Paradigma da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro durante o curso da infecção pelo <i>M. leprae</i>	20
Figura 1.2.2-1 Rede de comunicação celular induzida por IL-33.....	23
Figura 4.1-1 IL-33 como potencial biomarcador de hanseníase multibacilar.....	34
Figura 4.1-2 Biópsias de pele de pacientes com hanseníase apresentam tanto pró-IL-33 como IL-33 madura.....	36
Figura 4.1-3 Os níveis séricos de IL-33 são aumentados em pacientes MB e pacientes ENH quando comparados a pacientes RR	36
Figura 4.2-1 Expressão de ST-2 em biópsias de pele de pacientes com hanseníase.....	39
Figura 4.3-1 Pacientes MB e ENH exibem níveis de IL-33 livres maiores se comparados a pacientes PB.....	40
Figura 4.4-1 Grau de pureza em preparações de neutrófilos purificados a partir do sangue periférico.....	41
Figura 4.4-2 Estratégia para análise da expressão de CD62L, CD49d, CD11b e CXCR2 em neutrófilos de pacientes com hanseníase por citometria de fluxo multiparamétrica.	42
Figura 4.4-3 Neutrófilos de pacientes MB apresentam alta expressão de CD62L e CD49d quando comparados a neutrófilos PB.....	43

Figura 4.4.4 Neutrófilos de pacientes MB apresentam expressão aumentada de CD11b, CD62L e CD49d quando comparados a neutrófilos ENH.....	45
Figura 4.4.5 Pacientes com hanseníase apresentam subpopulação de neutrófilos CD62L+ CD49d+.....	47
Figura 4.4.6 Neutrófilos de pacientes MB apresentam aumento na expressão de CXCR2 quando comparados a neutrófilos de pacientes ENH.....	49

Lista de tabelas

Tabela 1.1.2-1 Registro de prevalência e número de novos casos detectados de hanseníase durante o ano de 2017.....	2
Tabela 1.1.2-2 Registro de novos casos detectados de hanseníase durante os anos de 2008 a 2017.....	2
Tabela 1.1.5-1 Esquema terapêutico para pacientes hansênicos do grupo PB.....	11
Tabela 1.1.5-2 Esquema terapêutico para pacientes hansênicos do grupo MB.....	12
Tabela 3.1-1 Características básicas dos pacientes incluídos no estudo.....	26
Tabela 3.5-1 Descrição dos anticorpos utilizados na citometria.....	28
Tabela 3.9-1 Descrição dos anticorpos usados para o western blotting.....	32
Tabela 4.1-1 Níveis séricos de IL-33 em pacientes com hanseníase MB.....	35
Tabela 4.2-1 Desfecho dos casos de pacientes MB.....	38

Lista de abreviaturas

ACK	<i>Ammonium-Chloride-Potassium</i>
BB	<i>Borderline Borderline</i>
BL	<i>Borderline</i> Lepromatoso
BSA	Albumina sérica bovina (do inglês, <i>Bovine Serum Albumin</i>)
BT	<i>Borderline</i> Tuberculóide
CD	Cluster de Diferenciação
CXCR2	Receptor 2 da família de quimiocinas CXC
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
ELISA	Ensaio imunoenzimático (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
FMO	Controle de fluorescência mínima (do inglês, <i>Fluorescence Minus One control</i>)
FSC	Dispersão frontal da luz (do inglês, <i>Forward SCatter</i>)
FSC-A	Dispersão frontal da luz que mede a área (do inglês, <i>Forward SCatter-Area</i>)
FSC-H	Dispersão frontal da luz que mede a altura (do inglês, <i>Forward Scatter-Height</i>)
GI2	Grau de incapacidade 2
HE	Hematoxilina-Eosina

ICAM	Molécula de adesão intercelular (do inglês, <i>InterCellular Adhesion Molecule</i>)
IFN γ	Interferon - γ
IgG	Imunoglobulina G
IL	InterLeucina
IB	Índice Baciloscópico
ILB	Índice baciloscópico da lesão
IMC	Imunidade Mediada por Células
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês, inducible Nitric Oxide Synthase)
LL	Lepromatoso
LPS	Lipopolissacarídeo
MB	MultiBacilares
MIF	Média de Intensidade de Fluorescência
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
MMP-9	Metaloproteinase de Matrix - 9
OMS/ <i>WHO</i>	Organização Mundial da Saúde (do inglês, <i>World Health Organization</i>)
PB	PauciBacilares
PBS	Tampão salina fosfato (do inglês, Phosphate Buffer Saline)
PFA	ParaFormAldeído
PGL-1	Glicolípido fenólico-1 (do inglês, <i>Phenolic GlycoLipid antigen-1</i>)

PQT	PoliQuimioTerapia
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês, RiboNucleic Acid)
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RR	Reação Reversa
RTqPCR	<i>Reverse Transcription quantitative real time Polymerase Chain Reaction</i>
SSC	Dispersão lateral da luz (do inglês, <i>Side SCatter</i>)
ST2	Supressão de tumorigenicidade 2 (do inglês, <i>Suppression of Tumorigenicity - 2</i>)
sST2	Supressão de tumorigenicidade solúvel - 2 (do inglês, <i>soluble Suppression of Tumorigenicity - 2</i>)
TBS	Solução salina tamponada Tris (do inglês, <i>Tris Buffer Saline</i>)
TGFβ	Fator de transformação do crescimento β (do inglês, <i>Transforming Growth Factor-β</i>)
Th	Células T auxiliares (do inglês, <i>T helper</i>)
TLR	Receptores do tipo Toll (do inglês, <i>Toll Like Receptor</i>)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês, <i>Tumor Necrosis Factor</i>)
TT	Tuberculóide
Treg	Células T reguladoras
VEGF-A	Fator de crescimento endotelial vascular A (do inglês, <i>Vascular Endothelial Growth Facto</i>

1 Introdução

1.1 Hanseníase

1.1.1 Aspectos gerais

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*. Ao longo de muitos anos estigmatizou pacientes no mundo inteiro, pois as estratégias de enfrentamento da doença baseavam-se no isolamento compulsório e na exclusão que afetava negativamente a qualidade de vida dos pacientes. O estigma associado à hanseníase compromete o controle da doença, retardando a busca pelo diagnóstico e tratamento (Trautman, 1984, Morgado *et al.* 2017).

Estima-se que mais de 90% das pessoas são resistentes à infecção pelo *M. leprae* e não irão desenvolver a doença. Já foi estabelecido que as pessoas com maiores riscos de adoecer são as que mantêm contato direto e contínuo com os portadores da hanseníase multibacilar não tratados (Moet *et al.* 2006, Moraes *et al.* 2006). A doença apresenta um longo período de incubação, onde as primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre 2 a 10 anos após a infecção (Godal *et al.* 1972).

1.1.2 Epidemiologia

A hanseníase é considerada uma doença negligenciada e essa definição, diz respeito aos aspectos socioeconômicos onde a maior prevalência da doença se dá pelas condições de pobreza e contribuem para a manutenção da desigualdade social e estigma da doença (Ministério da Saúde, Brasil. 2005). Além disso, é considerada um importante problema de saúde pública no Brasil pela Organização Mundial de Saúde (OMS). A OMS publica anualmente dados referentes à incidência de hanseníase no mundo, incluindo registros de novos casos e prevalência da doença além de determinar estratégias para a eliminação da hanseníase em países endêmicos (OMS 2016).

Estatísticas sobre a hanseníase referentes a 2017 foram publicadas em 2018 (OMS 2018). Ao todo, foram recolhidos dados de 150 países de seis regiões diferentes, sendo 41 países da África, 33 das Américas, 17 do Mediterrâneo Oriental, 25 da Europa, 10 da região Sudeste da Ásia e 24 do Pacífico Ocidental. A prevalência global de hanseníase foi de 192.713 casos (0,25/10.000 habitantes), isso representa um aumento de 20.765 casos em relação a 2016. Esse aumento foi observado em todas as regiões da OMS: 9189 casos na África, 5162 casos nas Américas, 1303 casos no Mediterrâneo Oriental, 3875

casos no Sudeste da Ásia e 1220 casos no Pacífico Ocidental. Os países da Europa reportaram uma prevalência registrada de 32 casos no final de 2017, enquanto 33 novos casos foram relatados durante o ano. Os dados são mostrados detalhadamente na tabela 1.1.2-1

Tabela 1.1.2-1: Registro de prevalência e número de novos casos detectados de hanseníase durante o ano de 2017. Modificado de OMS 2018.

Região	Número de casos registrados (prevalência/10 000 população), fim de 2017.	Número de novos casos detectados (novos casos de detecção / taxa por 100 000 população), durante 2017.
África	30 654 (0,28)	20 416 (1,90)
Américas	31 527 (0,31)	29 101 (2,86)
Mediterrâneo Oriental	4 405 (0,6)	3 550 (0,51)
Sudeste da Ásia	119 055 (0,6)	153 487 (7,72)
Pacífico Ocidental	7 040 (0,04)	4 084 (0,21)
Europa	32 (0)	33 (0)
Total	192 713 (0,25)	210 671 (2,77)

A análise realizada pela OMS no registro de novos casos detectados de hanseníase mostrou que entre 2008 e 2017 houve uma lenta diminuição do registro geral de novos casos no mundo ao longo desses 10 anos. Em 2008 foram registrados 249.007 novos casos, enquanto que em 2017 foram registrados um total de 210.671 novos casos e uma taxa de detecção de 2,77/100.000 habitantes (Tabela 1.1.2-2).

Tabela 1.1.2-2: Registro de novos casos detectados de hanseníase durante os anos de 2008 a 2017. Modificado de OMS 2018.

Período	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Região										
África	29 814	28 935	25 345	20 213	20 599	20 911	18 597	20 004	19 384	20 416
Américas	41 891	40 474	37 740	36 832	33 084	33 084	33 789	28 806	27 356	29 101
Mediterrâneo Oriental	3 938	4 029	4 080	4 357	1 680	1 680	2 342	2 167	2 834	3 550
Sudeste da Ásia	167 505	166 115	156 254	160 132	155 385	155 385	154 834	156 118	163 095	153 487
Pacífico Ocidental	5 859	5 243	5 055	5 092	4 596	4 596	4 337	3645	3 914	4 084
Europa								18	32	33
Total	249 007	244 796	228 474	226 626	232 857	215 656	213 899	210 740	217 968	210 671

De modo geral, o número de novos casos registrados em 2017 foi menor comparados ao ano anterior o qual registrou 217.968 novos casos no mundo, no entanto,

houve aumento do registro de novos casos em 5 regiões, dentre eles, a região americana foi a segunda com o maior número de novos casos detectados somando 29.101 casos. O Brasil contribuiu com cerca de 90% de todos os casos registrados nas Américas, com o total de 26.875 casos e em parâmetro mundial, ocupa o 2º lugar na classificação de novos casos registrados. Dentre o número total de casos registrados, 1718 eram crianças menores que 15 anos (OMS, 2018). O número de novos casos detectados em crianças pode indicar que ainda há transmissão ativa pelo *M. leprae* no Brasil (Ribeiro *et al.* 2018). O painel de distribuição geográfica de novos casos de hanseníase é mostrado na figura 1.1.2-1.

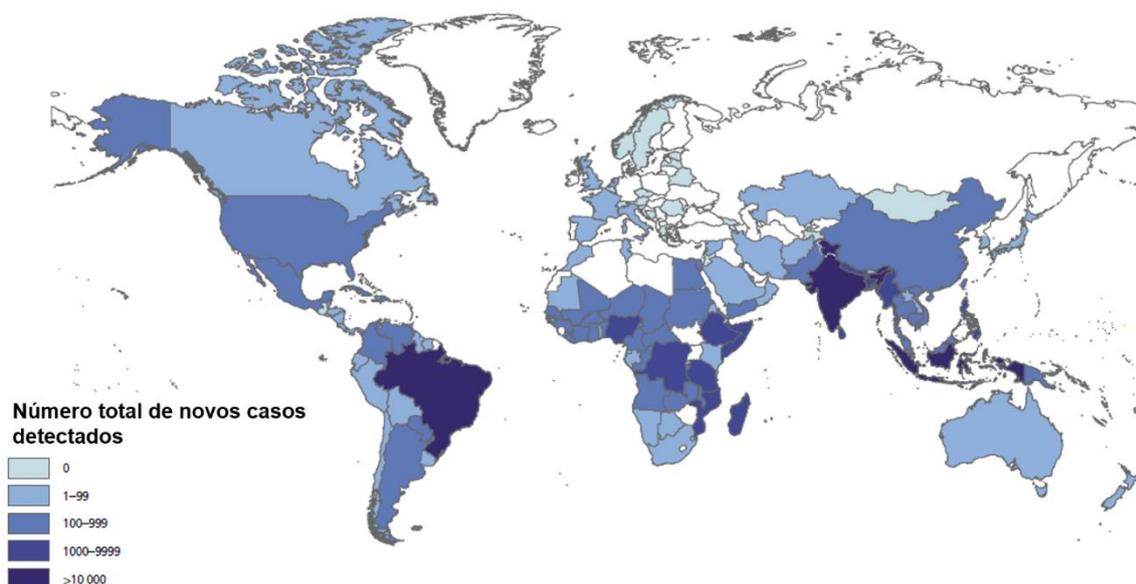


Figura 1.1.2-1: Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase em 2017. Adaptado OMS 2018.

A estratégia mais recente para a eliminação da hanseníase foi lançada em 2016, e compreende os anos de 2016 a 2020, a qual objetiva a aceleração de um mundo sem hanseníase, através do diagnóstico e tratamento precoce, impedindo o desenvolvimento de incapacidades físicas e transmissão da doença. Atualmente, a classificação de incapacidades físicas varia de 0 a 2. O grau de incapacidade 2 (GI 2), representa maior desenvolvimento de incapacidade física e as metas propostas por tal estratégia incluem a diminuição no número de casos que apresentem GI 2 entre pacientes de até 15 anos e redução de novos casos GI 2 para menos de ≤ 1 caso por milhão de habitantes (OMS 2016). Os números de novos casos registrados com GI 2 refletem diretamente o

diagnóstico precoce da doença, além de fatores como a conscientização sobre a hanseníase na sociedade e a capacidade do sistema de saúde em diagnosticar a doença de maneira precoce. Para avaliar em número esse reflexo, a OMS recolheu essas informações dos países que comumente disponibilizam dados para análise. A análise dos dados que foram disponibilizados pelo Brasil revelou que houve aumento de casos diagnosticados com GI 2 em 2017 comparado a 2016. Em 2016 foram registrados 1.736 e em 2017, 1.949 casos e destes, 54 casos foram registrados em crianças menores que 15 anos. A média global de GI 2 foi de 2.5 por milhão de habitantes, acima da média para a meta global que é de 1 por milhão de habitantes (OMS 2018). Esses dados demonstram que apesar do esforço exercido pela OMS e o empenho dos países endêmicos em eliminar a hanseníase, ainda resta um longo caminho para a erradicação da hanseníase no mundo.

1.1.3 Agente Etiológico

O *M. leprae* foi descoberto em 1873 pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen e a hanseníase foi a primeira doença associada a uma origem bacteriana. Quanto à classificação taxonômica, o *M. leprae* pertence à ordem *Actinomycetales*, a família *Mycobacteriaceae* e gênero *Mycobacterium*. Apresenta formato de bacilo reto ou levemente encurvado, com extremidades arredondadas, podendo medir aproximadamente de 1 a 8 µm de comprimento e 0,2 a 0,5 µm de diâmetro. É considerado bacilo álcool ácido resistente quando submetido à coloração de Ziehl-Neelsen, pois é corado em vermelho pela fucsina e devido ao seu alto teor lipídico não se descora quando lavado com álcool e ácido. É diferente de outras micobactérias, pois em esfregaços de pele ou em cortes histológicos, são vistos em arranjos especiais denominados globais (Figura 1.1.3-1) que resultam da sólida união dos bacilos através de uma substância chamada de gléia (Goulart *et al.* 2002, Suzuki *et al.* 2012, Lastória *et al.* 2014).

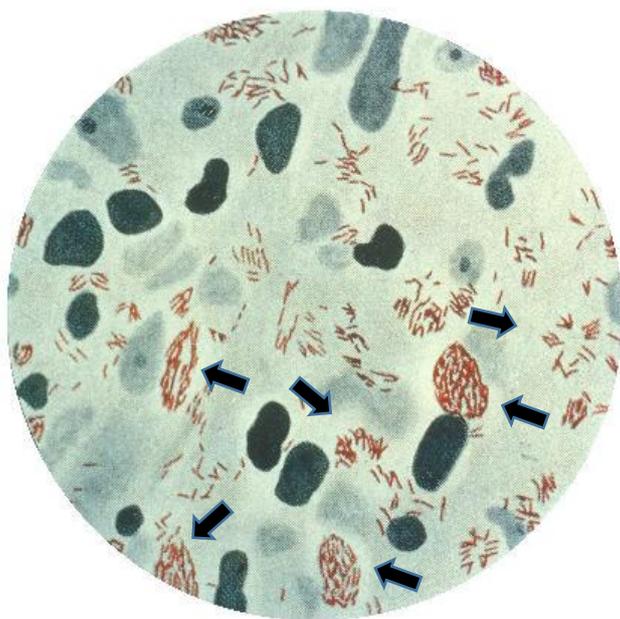


Figura 1.1.3-1: Fotomicrografia de *M. leprae* na lesão de pele de paciente multibacilar – Os bacilos (corados em vermelho) formam arranjos globiais que foram indicados por setas, característicos do *M. leprae*. As células foram coradas em azul. Fonte: adaptado de Universidade de Stanford <http://www.stanford.edu/group/parasites/ParaSites> 2005/Leprosy/bio.htm. Acesso em: 02 de maio de 2019.

O *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório que infecta principalmente macrófagos da pele e células de Schwann, se multiplica pelo processo de divisão binária, expandindo-se lentamente, por volta de 12 a 14 dias. As lesões em pacientes hansênicos, ocorrem principalmente na pele, mucosa nasal e nervos periféricos, sugerindo que o bacilo tenha preferência por temperaturas menores que 37° C. Esse fato também foi observado por Shepard a partir da inoculação do *M. leprae* em coxim plantar de camundongos onde pôde observar que para melhor crescimento do bacilo a temperatura média do tecido plantar deveria estar entre 27-30° C (Shepard 1960, Hastings *et al.* 1988).

Em ambiente parasitário como biópsias, o bacilo pode se manter viável por até 10 dias sob temperatura de 4° C. No meio ambiente, pode se manter viável por até 9 dias (Desikan 1977), entretanto, o cultivo de *M. leprae in vitro* ainda é um desafio.

Em uma tentativa de cultivar o bacilo, Amako *et al.* 2016 não obtiveram sucesso. A estratégia do grupo, foi cultivar *M. leprae* da cepa Thai-53 em meio líquido suplementado com diferentes materiais biológicos como por exemplo: soro bovino, extrato de tecido de camundongo nude e plasma sanguíneo humano. Nesse experimento,

puderam observar baixo crescimento *in vitro* do bacilo, entretanto, o crescimento não foi exponencial.

Ferreira *et al.* 2018, demonstraram que carrapatos podem ser reservatórios de *M. leprae* assim como cultura de células de linhagem de carrapatos podem representar uma técnica promissora para o cultivo do bacilo *in vitro*. Nesse trabalho, foi possível detectar *M. leprae* viável no tecido intestinal desses carrapatos após 15 dias de infecção, além disso, o grupo observou que houve crescimento dessa bactéria *in vitro* em células da linhagem IDE8.

Análises bioquímicas mostraram que a parede celular de micobactérias é extremamente complexa, formada por macromoléculas e rica em lipídios. O peptidoglicano é uma estrutura bacteriana comum a muitas micobactérias, entretanto o *M. leprae* apresenta substituição incomum de alanina pela glicina no tetrapeptídeo e essa substituição pode levar a vantagens patogênicas como, por exemplo, aumentar à resistência a degradação (Draper *et al.* 1987).

No *M. leprae*, os ácidos graxos de cadeia longa formam dois grupos: alfamicolatos e betamicolatos e podem ser usados taxonomicamente para diferenciá-los de outras micobactérias. Uma das moléculas mais importantes que compõe a parede celular do *M. leprae* é o glicolipídio fenólico-1 (PGL-1) que tem se mostrado específico e possui atividade imunogênica durante a infecção (Hunter *et al.* 1981). Em modelo experimental utilizando o zebrafish, foi demonstrado que o estímulo de macrófagos com PGL-1 elevou a produção de óxido nítrico por essas células, aumentando o dano tecidual e sugerindo que esse processo pode estar envolvido no dano neural dos pacientes com hanseníase (Madigan *et al.* 2017).

Díaz Acosta *et al.* 2018, demonstraram que o PGL-1 aumenta a capacidade de adesão e internalização de micobactérias vivas em células de Schwann quando comparados a micobactérias vivas que não expressavam o PGL-1, demonstrando que essa molécula é extremamente importante para estabelecer a infecção em células de Schwann.

1.1.4 Aspectos clínicos gerais

A hanseníase é uma doença granulomatosa crônica que afeta principalmente a pele e nervos periféricos, mas também pode afetar outros tecidos como o sistema reticuloendotelial, ossos e articulações, membranas mucosas, olhos, testículos, músculos e suprarrenais. Os danos nos nervos periféricos podem levar ao comprometimento

sensorial e motor com deformidades e incapacidades físicas características da hanseníase (Hastings *et al.* 1988, Britton *et al.* 2004, Talhari *et al.* 2015).

Grande parte dos pacientes apresentam lesão macular e hipopigmentada, considerada como inicial e característica de hanseníase. As máculas não têm mais de 3 a 4 cm de largura, apresentam superfície lisa e não escamosa ou pruriginosa. Em pacientes com a pele clara, as lesões podem ser avermelhadas e em pacientes com a pele escura, podem ser acobreadas. Uma característica importante em lesões de hanseníase é que elas apresentam sensação de anestesia, com perda de sensibilidade local, perdendo a capacidade de distinguir entre frio ou calor (Talhari *et al.* 2015).

Os danos nos nervos podem ser divididos em duas partes: troncos nervosos periféricos e pequenos nervos dérmicos. No primeiro, pode ser afetado túnel fibro-ósseo próximos à superfície da pele, incluindo nervo auricular grande (pescoço), nervo ulnar (cotovelo), nervo cutâneo radial e mediano (punho), nervo poplíteo radial (pescoço da fíbula) e nervo tibial posterior. O nervo tibial posterior é o mais comumente afetado, seguido do nervo ulnar, mediano, poplíteo lateral e facial. O dano em pequenos nervos dérmicos leva a alterações como a hipoestesia e anedrose (Britton *et al.* 2004).

A manifestação inicial da hanseníase pode ser classificada como a forma indeterminada da doença, onde a resposta do hospedeiro ao bacilo não é suficiente para determinar uma classificação dentro do espectro clínico estabelecido. Esses pacientes podem apresentar cura espontânea ou evoluir para um quadro clínico dentro do espectro (Ridley *et al.* 1966, Hastings *et al.* 1988, Goulard *et al.* 2002).

1.1.5 Classificação e Espectro de formas clínicas

A doença apresenta um amplo espectro de formas clínicas associadas à sintomatologia que depende da resposta do hospedeiro ao *M. leprae*. As classificações mais utilizadas para a hanseníase são as propostas por Ridley e Jopling em 1966 e a classificação simplificada pela OMS em 1982. Ridley e Jopling propuseram uma classificação para o espectro da doença levando em consideração aspectos clínicos, baciloscópico, fatores imunológicos e histopatológicos dividindo os pacientes em 5 grupos distintos sendo eles Tuberculóide (TT), Borderline tuberculóide (BT), Borderline borderline (BB), Borderline lepromatoso (BL) e Lepromatoso (LL). A seguir, descreveremos essa classificação.

TT - Os pacientes classificados nesse polo apresentam maior resistência à infecção pelo *M. leprae* apresentando forte resposta celular ao bacilo e lesão única de pele. A lesão apresenta bordas assimétricas, hipocrômica ou eritematosa delimitada por micropápulas e limites externos nítidos e bem definidos, geralmente, apresenta superfície áspera e com poucos pelos podendo ser escamosa. Além disso, a lesão é marcadamente anestésica e podem aparecer na face, couro cabeludo, membros, axilas, virilha e períneo.

Análises histopatológicas das lesões cutâneas revelam granulomas de células epitelióides bem diferenciadas com células de Langhans e contornadas por uma densa zona de infiltração de linfócitos, podendo haver invasão ou destruição dos nervos cutâneos e não são encontrados bacilos.

Além da pele, o envolvimento de troncos nervosos pode levar ao espessamento grosseiro e irregular do nervo e torná-lo palpável nas proximidades de uma lesão, causando dor e edema. O dano neural pode causar anestesia, analgesia, hiperalgesia e fraqueza muscular.

BT – As lesões assemelham-se ao polo TT na aparência e perda de sensibilidade, entretanto podem ser diferenciadas pelo fato de serem menores e mais numerosas. As bordas são menos evidentes, o crescimento de pelos no local não é afetado e o número de nervos acometidos é maior.

Histologicamente é difícil distinguir entre BT e TT, mas, difere-se de lesões BB pela focalização das células epitelióides, cercadas pela zona de linfócitos ou pela presença de células de Langerhans. Os nervos associados ao granuloma encontram-se inchados e infiltrados, além disso, a inervação é diminuída. Os pacientes classificados como BT podem ter baciloscopia positiva, apresentando poucos bacilos.

BB – Os pacientes classificados nesse grupo apresentam número de lesões intermediárias entre os polos TT e LL, além disso, apresentam um grau moderado de anestesia, lesões eritematosas e com formatos irregulares.

A principal característica histológica é a presença de células epitelióides bem desenvolvidas, porém menores do que as de lesões TT e disseminadas difusamente pelo granuloma exibindo ausência de zonas ocupadas por linfócitos. As células de Langerhans são ausentes e os pequenos nervos podem exibir moderada proliferação de células de Schwann que podem ser reconhecidas com facilidade. A baciloscopia é positiva e bacilos podem ser encontrados na lesão.

BL – As lesões tendem a ser mais numerosas, brilhantes, com menor definição de limites, ligeira perda de sensibilidade e numerosos bacilos.

Histologicamente, o granuloma é composto por histiócitos que tendem a evoluir na direção de células epitelióides, os linfócitos são escassos. As células hospedeiras dos bacilos são histiócitos que podem exibir característica espumosa. O granuloma se difere de lesões LL por áreas de infiltração linfocitária.

LL – Os pacientes desse polo são mais suscetíveis à infecção resultando na disseminação da doença, portanto, apresentam múltiplas lesões distribuídas bilateral e simetricamente e na maioria das vezes eritematosa. As máculas são pequenas com bordas vagas e difíceis de ver, têm superfície lisa e brilhante, não anestésica e podem aparecer discretamente hipopigmentada em peles escuras. Não há espessamento de nervos periféricos. Em homens, o acometimento dos testículos pode levar a atrofia e conseqüentemente esterilidade, impotência e ginecomastia.

O granuloma é composto por histiócitos que exibem um grau variável de alteração gordurosa, com a produção de células espumosas e eventualmente globos. Glóbulos multinucleados ou alterações espumosas são encontradas apenas em lesão LL e os linfócitos são escassos. Os nervos podem apresentar dano estrutural, mas não infiltração celular. Muitos bacilos são vistos nesse tipo de lesão.

Em 1982, um comitê da OMS propôs uma classificação simplificada e operacional para facilitar o diagnóstico e tratamento dos pacientes com hanseníase. Essa classificação era baseada no índice baciloscópio e dividida em Paucibacilares (PB) e Multibacilares (MB). Em 1988, para facilitar o diagnóstico em lugares de difícil acesso e que apresentavam dificuldades para definir o diagnóstico baseado na baciloscopia, a OMS recomendou que o tratamento segue a orientação da classificação segundo número de lesões e comprometimento neural, estabelecendo como PB, pacientes que apresentem até cinco lesões e/ou apenas um tronco nervoso envolvido. Pacientes MB seriam definidos por apresentarem mais que cinco lesões e/ou comprometimento de mais de um tronco nervoso como demonstrada na figura 1.1.5 -1. Assim, o diagnóstico seria facilitado em lugares onde o exame microscópico para detectar o bacilo estão indisponíveis (OMS 1982, OMS 1988, Souza 1997).

PB: Pacientes desse grupo apresentam poucos ou inexistentes bacilos (índice baciloscópico < 2), até 5 lesões de pele e reação positiva ao teste de Mitsuda. São incluídos nesse grupo, pacientes TT e BT.

MB: Pacientes MB apresentam múltiplas lesões que são pequenas e brilhantes. A distribuição das lesões é simétrica, muitos nervos são comprometidos e a baciloscopia é positiva com índice baciloscópico > 2. São incluídos nesse grupo pacientes BB, BL e LL.

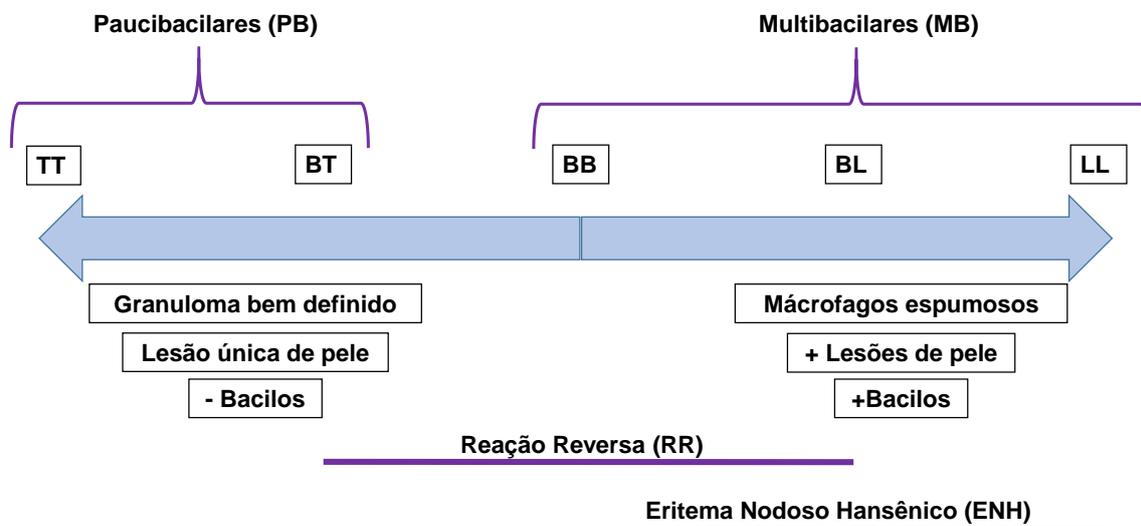


Figura 1.1.5-1: Representação esquemática da classificação de formas clínicas da hanseníase. A classificação proposta por Ridley e Jopling é baseada principalmente em aspectos histopatológicos, número de lesões e carga bacilar. Essa classificação separa os pacientes em 5 grupos distintos: Tuberculóide (TT), Boderline tuberculóide (BT), Boderline boderline (BB), Boderline lepromatoso (BL) e Lepromatoso (LL). Em um dos extremos encontram-se os pacientes do polo TT, apresentando granuloma bem definido, lesão única de pele e os bacilos são ausentes. No polo oposto, encontram-se os pacientes LL, com múltiplas lesões de pele, alta carga bacilar e o granuloma é composto por mácrofagos com grau variável de alteração gordurosa, podendo apresentar aspecto espumoso. Entre os polos encontram-se os pacientes boderline com aumento gradual no número de lesões e carga bacilar. A classificação simplificada pela OMS subdivide esses pacientes em dois grupos distintos: Paucibacilares (PB) que incluem pacientes TT e BT e Multibacilares (MB) que incluem pacientes BB, BL e LL.

Os pacientes podem ainda desenvolver reações antes, durante ou após o início do tratamento. As principais reações são a Reação reversa (RR) que acomete pacientes do grupo boderline e o ENH que acomete pacientes MB. Esquema desenvolvido pela autora. Ridley e Jopling, 1966, OMS 1982, OMS 1988.

O tratamento da hanseníase é feito com poliquimioterapia (PQT), que envolve o uso de uma combinação de antibióticos – Dapsona, Rifampicina e Clofazimina. Juntos, são extremamente eficazes contra a infecção por *M. leprae*. O esquema de tratamento foi definido pela OMS em 1982 e é baseado na classificação dos pacientes em PB e MB (Van-Veen *et al.* 2009, Reibel *et al.* 2015). A recomendação para tratamento de pacientes PB se baseia no uso de Dapsona e Rifampicina, com duração de 6 meses, o esquema terapêutico é mostrado detalhadamente na tabela 1.1.5-1

Tabela 1.1.5-1 Esquema terapêutico para pacientes hansênicos do grupo PB. Ministério da saúde, Brasil. Acesso em 02.06.2019

Adulto	Rifampicina (RFM): dose mensal de 600mg (02 cápsulas de 300mg) com administração supervisionada.
	Dapsona (DDS): dose mensal de 100mg supervisionada e dose diária de 100mg autoadministrada.
Criança	Rifampicina (RFM): dose mensal de 450mg (01 cápsula de 150mg e 01 cápsula de 300mg) com administração supervisionada.
	Dapsona (DDS): dose mensal de 50mg supervisionada e dose diária de 50mg autoadministrada.
<p>Duração: 06 doses.</p> <p>Seguimento dos casos: comparecimento mensal para dose supervisionada.</p> <p>Critério de alta: o tratamento estará concluído com seis (06) doses supervisionadas em até 09 meses. Na 6ª dose, os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, à avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura.</p>	

O esquema de tratamento para pacientes multibacilares inclui o uso da Rifampicina, Dapsona e Clofazimina além de maior tempo de administração desses fármacos. Os dados sobre a administração da PQT em pacientes MB são mostrados com mais detalhes na tabela 1.1.5-2

Tabela 1.1.5-2: Esquema terapêutico para pacientes hansênicos do grupo MB. Ministério da saúde, Brasil. Acesso em 02.06.2019.

Adulto	Rifampicina (RFM): dose mensal de 600mg (02 cápsulas de 300mg) com administração supervisionada.
	Dapsona (DDS): dose mensal de 100mg supervisionada e uma dose diária de 100mg auto-administrada.
	Clofazimina (CFZ): dose mensal de 300mg (03 cápsulas de 100mg) com administração supervisionada e uma dose diária de 50mg auto-administrada.
Criança	Rifampicina (RFM): dose mensal de 450mg (01 cápsula de 150mg e 01 cápsula de 300mg) com administração supervisionada.
	Dapsona (DDS): dose mensal de 50mg supervisionada e uma dose diária de 50mg auto-administrada.
	Clofazimina (CFZ): dose mensal de 150mg (03 cápsulas de 50mg) com administração supervisionada e uma dose de 50mg auto-administrada em dias alternados.

Duração: 12 doses.

Seguimento dos casos: comparecimento mensal para dose supervisionada.

Critério de alta: o tratamento estará concluído com doze (12) doses supervisionadas em até 18 meses.

Na 12ª dose, os pacientes deverão ser submetidos ao exame dermatológico, à avaliação neurológica simplificada e do grau de incapacidade física e receber alta por cura.

Os pacientes MB que excepcionalmente não apresentarem melhora clínica, com presença de lesões ativas da doença, no final do tratamento preconizado de 12 doses (cartelas) deverão ser encaminhados para avaliação em serviço de referência (municipal, regional, estadual ou nacional) para verificar a conduta mais adequada para o caso.

1.1.6 Episódios reacionais

Os pacientes com hanseníase podem desenvolver episódios reacionais durante o curso da doença, inclusive antes, durante e após o início do tratamento. Esses episódios são agudos e interrompem a cronicidade da doença, agravando o quadro clínico do paciente. As principais reações na hanseníase são a Reação Reversa e o Eritema Nodoso Hansênico e 40% dos pacientes hansênicos desenvolvem um desses episódios reacionais (Ridley *et al.* 1966, Brito *et al.* 2008).

Reação Reversa: Também conhecida como Reação do tipo I, a Reação Reversa (RR) é a principal causa de incapacidade física e deformidades na hanseníase. Ao desenvolver esse tipo de reação, os pacientes apresentam novas lesões, reativação de lesões antigas e exacerbação da resposta inflamatória que podem estar associadas ao comprometimento do nervo periférico. Os sintomas variam de hiperestesia cutânea difusa, parestesia e alodinia. Contudo, pode ocorrer ainda, comprometimento do nervo motor, associado ou

não ao espessamento e sensibilidade do nervo podendo levar a perda de força e/ou percepção sensorial. Os pacientes podem se queixar de sensação de ardência nas lesões cutâneas, dores nas extremidades do corpo ou na face e os pés e mãos podem apresentar atrofia, sudorese ou áreas ressecadas (Sales *et al.* 2013, Andrade *et al.* 2015, Naafs *et al.* 2016).

Histologicamente, os granulomas se tornam mais organizados e há aumento no número de linfócitos e células epitelióides. Pode-se observar redução na carga bacilar ou desaparecimento de bacilos intactos (Lastória *et al.* 2014).

A RR é considerada uma reação de hipersensibilidade tardia a antígenos do *M. leprae*, estando associada à depuração de bacilos na lesão aumentando a imunidade mediada por células contra o patógeno resultando em inflamação (Inkeles *et al.* 2016). Esse tipo de reação, geralmente acomete pacientes do grupo intermediário ou *borderline*, mas raramente também pode se desenvolver em pacientes LL (Nery *et al.* 2013). O diagnóstico para RR é complexo, pois requer um profissional familiarizado com a hanseníase. Muitos pacientes apresentam poucos sintomas, levando ao diagnóstico tardio ou até mesmo a falta do diagnóstico correto que deve ser feito baseado no desenho de dispersão das lesões e uma avaliação extremamente cuidadosa da função nervosa autonômica, motora e sensitiva. O tratamento é realizado com uso de corticosteroides orais por cerca de 4 a 6 meses (Naafs *et al.* 2016).

Os episódios podem ser: crônicos, recorrentes e tardios. Episódios crônicos são caracterizados por erupções cutâneas consecutivas ou comprometimento neural. Episódios recorrentes são definidos com o reaparecimento de sinais e sintomas reacionais após 6 a 12 semanas do início do tratamento. Já os episódios tardios, ocorrem após o tratamento de hanseníase com PQT (Andrade *et al.* 2015).

O diagnóstico correto e tratamento precoce são fundamentais para reduzir a recorrência de reações e minimizar deformidades devidas ao comprometimento neural (Pai *et al.* 2012).

Eritema Nodoso Hansênico: O ENH é uma complicação imunológica que os pacientes com hanseníase podem desenvolver estando associados à inflamação sistêmica que leva a febre, múltiplas lesões de pele, neurite, artrite, inflamação ocular, nefrite e linfadenites. O estado inflamatório do ENH causa aumento significativo na morbidade dos pacientes, podendo levar a morte se não forem tratados (Walker *et al.* 2014, Walker *et al.* 2015).

O ENH afeta pacientes borderline (BB e BL) e pacientes LL, quanto maior o índice baciloscópico, maior o risco de desenvolver ENH. O episódio, geralmente ocorre após 2 anos de início da PQT e alguns pacientes experimentam múltiplos episódios (Manandhar *et al.* 1999, Walker *et al.* 2007, Polycarpou *et al.* 2017).

Histologicamente, lesões de pele de pacientes durante esse episódio reacional, apresentam intenso infiltrado inflamatório de neutrófilos na derme profunda, levando a ser considerado um marco histológico exclusivo do ENH, pois não se apresenta em outras formas clínicas da doença (Lastória *et al.* 2014, Schmitz *et al.* 2016).

O tratamento de episódio de ENH é feito com o uso da Talidomida que é um imunossupressor eficaz para controle da inflamação sistêmica, porém seu uso é controlado devido a efeitos colaterais graves relacionados à capacidade teratogênica e seu uso é contraindicado para mulheres em idade fértil, nesses casos é indicado o uso de outros corticoesteróides como por exemplo a prednisona (Van-Veen *et al.* 2009, Millrine *et al.* 2017).

Tem sido proposto tratamentos alternativos como foi mostrado por Ramien *et al.* 2011, onde o tratamento de uma paciente que apresentou resistência tanto a Talidomida quanto a Prednisona, foi eficazmente controlado com o uso de inibidor de TNF e esse tratamento tem sido visto como promissor para o tratamento do ENH quando a Talidomida não for aconselhável (Chowdhry *et al.* 2016).

A maior diferença entre a RR e o ENH, é que diferente dos episódios RR, o ENH apresenta inflamação sistêmica e generalizada. Em pacientes BL é difícil discernir entre RR e ENH, as reações podem ocorrer juntas ou em sequência, por isso é importante uma análise criteriosa sobre os sintomas que os pacientes apresentam para o diagnóstico correto. Durante o ENH, os pacientes apresentam mal-estar em geral, e pode haver febre, envolvimento de órgãos e articulações, entretanto, essas complicações não estão envolvidas na RR. Além disso, as lesões de pacientes ENH são visíveis e dolorosas, apresentam pápulas e nódulos confluentes enquanto na RR, as lesões podem ser anestésicas e com aparência mais homogênea (Naafs *et al.* 2016, Rêgo *et al.* 2018).

1.1.7 Desenvolvimento da resposta imunológica contra o *M. leprae*.

A resposta imunológica de pacientes com hanseníase resulta diretamente da interação do *M. leprae* com o hospedeiro e define a classificação espectral da doença. Em um dos extremos do espectro clínico da hanseníase, encontram-se os pacientes TT que é o polo mais resistente da hanseníase, restringindo o crescimento bacteriano e

apresentando número de lesões limitadas. No outro extremo, pacientes LL são definidos como o polo mais susceptível da doença, pois os pacientes apresentam alta carga bacilar e disseminação das lesões. Essas apresentações clínicas correlacionam-se com o desenvolvimento da imunidade mediada por células (IMC) (Modlin, 2010).

A medida padrão para calcular a IMC, consiste na reação de Mitsuda ou teste cutâneo da Lepromina. O teste consiste na inoculação de Lepromina através de injeção intradérmica que pode provocar uma reação local causando nódulo palpável. Esse nódulo é medido após 3 semanas e é classificado como positivo para pacientes TT. A ausência da formação do nódulo, negativa o teste e é geralmente obtido em pacientes LL. Em contraste, os níveis sorológicos envolvendo anticorpos anti-PGL-1 e a antígenos específicos para *M. leprae* são predominantes em pacientes LL e praticamente inexistentes nos pacientes TT, indicando que a resposta imune predominante em pacientes LL é humoral, que é específica, porém ineficaz para o controle do bacilo (Cho *et al.* 1983, Modlin, 2010). A correlação inversa entre IMC e imunidade humoral presentes no espectro da hanseníase, pode ser investigada em termos de resposta imune adaptativa.

A primeira linha de interação entre o *M. leprae* e células do hospedeiro ocorrem através de receptores altamente conservados, capazes de reconhecer padrões associados a patógenos. Os receptores da família do tipo Toll (TLR) estão presentes em células do sistema imunológico inato, podendo participar do processo de fagocitose e atividade microbicida (Doyle *et al.* 2004, Bochud *et al.* 2009, Lim *et al.* 2013). Já foi visto que lipoproteínas presentes na membrana de *M. leprae* são capazes de induzir a maturação de células dendríticas por intermédio de TLR 2 e esse mecanismo leva a ativação da resposta imune adaptativa (Hertz *et al.* 2001, Krutzik *et al.* 2005). Além de TLR2, TLR4 e TLR9 demonstraram capacidade não só de interagir com micobactérias, mas também no aumento da susceptibilidade do hospedeiro em desenvolver a hanseníase (Bochud *et al.* 2009, Oldenburg *et al.* 2018).

Subgrupos distintos de linfócitos T correlacionam-se com a resposta ao *M. leprae*, principalmente células CD4+ e CD8+. As lesões de pacientes TT apresentam intenso infiltrado de linfócitos T CD4+. De maneira mais ordenada, as células T CD4+ estão no centro da lesão e as células T CD8+ apresentam perfil supressor. As células T CD4+ produzem citocinas pró-inflamatórias levando a formação de granulomas bem definidos, em contraste pacientes LL apresentam maior quantidade de linfócitos T CD8+ nas lesões. As células T CD4+ provenientes de lesões TT, são capazes de proliferar em culturas estimuladas com *M. Leprae*, *in vitro*, por outro lado células T CD8+ de lesão de pacientes

LL, são ativadas especificamente por *M. Leprae* e capazes de suprimir a ativação de células T CD4+ *in vitro* (Modlin *et al.* 1986, Salgame *et al.* 1991).

A resistência à patógenos intracelulares como micobactérias, está diretamente relacionada a capacidade do hospedeiro em montar uma resposta eficaz de linfócitos T auxiliares (Th) (Moraes *et al.* 2006). As células Th podem ser subdivididas em diferentes subgrupos de células efetoras com base em sua capacidade funcional e no perfil de citocinas que produzem. O subgrupo Th1 secreta citocinas que geralmente são associadas a processos inflamatórios como por exemplo Interferon γ (IFN γ) e Fator de Necrose Tumoral (TNF), conhecidas por induzirem respostas do tipo celular. O subgrupo Th2 produz citocinas como Interleucina (IL) -4 e IL-5, que induzem a proliferação e diferenciação de linfócitos B, associando-se assim a um perfil de desenvolvimento de respostas do tipo humoral. O fator mais importante envolvido na diferenciação e polarização de linfócitos Th é o estímulo de citocinas a qual são submetidos. Existem evidências de que o estímulo com IFN γ e IL-12 cria um ambiente propício para a diferenciação de um perfil Th1 enquanto que a IL-4 é essencial para a diferenciação de células com perfil Th2 (Constant *et al.* 1997, Rodrigues *et al.* 2017, Sousa *et al.* 2017).

Na hanseníase os pacientes desenvolvem perfis de ativação de linfócitos Th de maneiras distintas e esses perfis se correlacionam com as manifestações clínicas presentes no espectro clínico da doença (Sadhu *et al.* 2018). Os principais perfis estudados na hanseníase são Th1, Th2 e mais recentemente Th17 e essa polarização tem sido vista como um elemento chave na regulação da resposta imune dos pacientes durante o curso da infecção (Sousa *et al.* 2017).

Análises histoquímicas de lesões de pele de pacientes TT apresentam um perfil de citocinas com padrão Th1, como foram mostrados por Arnoldi *et al.* em 1990 que observaram aumento de IFN γ e TNF nas lesões desses pacientes. Em 1991, Yamamura *et al.* estabeleceram um perfil de citocinas presentes na hanseníase, a partir de análises da expressão de RNAm de biópsias lesionais de pacientes TT e LL. Pacientes TT demonstraram padrão de citocinas predominantemente com perfil de resposta Th1 como IL-2 e IFN γ . Por outro lado, pacientes LL apresentaram padrão de citocinas com perfil de resposta Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10.

Agregando a esses achados, em 1998 Moubasher *et al.* confirmaram esse perfil de resposta a partir da dosagem de níveis séricos de algumas dessas citocinas. Pacientes TT apresentaram aumento dos níveis séricos de IFN γ e TNF e houve correlação negativa

entre os níveis séricos dessas citocinas e o índice baciloscópico. Por outro lado, pacientes LL apresentam um padrão de citocinas oposto com altos níveis séricos de IL-10.

Finalmente, Rodrigues *et al.* 2017, demonstraram através de análises por imunofluorescência de marcadores específicos para células Th1 e Th2, a predominância de células Th1 em lesões de pacientes TT e células Th2 em lesões de pele de pacientes LL.

Recentemente foi descrito um novo subconjunto de células Th, nomeadas de Th17 devido à alta produção de IL-17, entretanto também produzem IL-22. A produção dessas citocinas estão envolvidas na neutrofilia, remodelação e reparo tecidual além da produção de proteínas antimicrobianas. Diferente das células Th1 e Th2, a ativação dessa subpopulação requer tanto TGF β , que é uma citocina imunossupressora, quanto IL-6 que é uma citocina pró-inflamatória (Korn *et al.* 2009).

De maneira geral, as células Th17 apresentam um perfil pró-inflamatório e foram identificadas em amostras de pacientes do polo TT na hanseníase. A dinâmica da resposta de células Th17 têm sido sugeridas como crucial para o desenvolvimento de uma resposta eficaz contra o bacilo, já que a IL-17 induz a produção de TNF, IL-6 e iNOS levando a produção de espécies reativas de oxigênio intermediário que destroem o bacilo e potencializam o ambiente pró-inflamatório (Saini *et al.* 2013, Sousa *et al.* 2017).

Na hanseníase, a resposta imunológica é extremamente complexa e envolve mecanismos tanto da imunidade inata quanto da adaptativa. Os macrófagos são células do sistema imune inato responsáveis por fagocitar microrganismos e apresentam um perfil distinto nas lesões de hanseníase. Histologicamente, são vistos ativados nas lesões de pacientes TT e por isso são chamados de células epitelióides, nas lesões de pacientes LL, são observados macrófagos contendo numerosos bacilos e com aparência espumosa característica, como foi descrito por Rudolf Virchow em 1983. As células de Virchow, como ficaram conhecidas, apresentam aspecto espumoso devido ao alto teor lipídico possivelmente induzido pelo *M. leprae* (Sacurai *et al.* 1970, Mattos *et al.* 2010) e já foi visto que os macrófagos espumosos presentes nas lesões de pacientes LL apresentam um fenótipo regulatório que contribuem para a susceptibilidade a infecção induzida pelo *M. leprae* e podem contribuir para um ambiente favorável para a sobrevivência do bacilo (Moura *et al.* 2012).

Assim como na dicotomia Th1 e Th2, macrófagos podem exibir perfis de ativação distintos. Macrófagos M1 são classicamente ativados por agentes microbianos e promovem a defesa do hospedeiro, entretanto, macrófagos M2 realizam funções

homeostáticas como, por exemplo, fagocitose necessária para o remodelamento tecidual. Essa polarização pode ser induzida por diferentes citocinas. Já foi visto que IFN γ e TNF podem induzir a polarização de macrófagos para um perfil M1, enquanto o estímulo com IL-4 e IL-10 induz para o perfil M2 (Mosser *et al.* 2008, Montoya *et al.* 2009).

A medida em que os monócitos são recrutados para o tecido, eles se diferenciam em macrófagos. Kibiie *et al.* 2016, mostraram em um modelo de cocultura de monócitos com células endoteliais que o endotélio é capaz de instruir a polarização de macrófagos em M1 e M2. Células endoteliais não estimuladas, induziram um perfil de macrófagos para M2, entretanto, células endoteliais estimuladas com IFN γ foram capazes de induzir a polarização de macrófagos para M1 mediados por Jagged-1. Além disso, o grupo mostrou a presença dessa proteína em lesões de pacientes TT e esse mecanismo foi proposto para explicar a polarização de macrófagos na hanseníase.

De fato, macrófagos de pacientes LL apresentam fenótipo regulatório que contribui para a imunossupressão presente nesses pacientes. Já foi visto que macrófagos de pacientes LL tem alta expressão de CD163, um receptor que reconhece o complexo hemoglobina-haptoglobina, e a expressão dessa molécula é estimulada diretamente pelo *M. leprae* em monócitos de doadores saudáveis, induzindo o perfil regulatório de macrófagos com alta produção de IL-10, TNF e TGF β . O bloqueio de CD163 diminuiu a captação de *M. leprae* em monócitos humano, mostrando que a expressão dessa molécula é importante para a modulação de resposta da célula hospedeira, permitindo a criação de um ambiente inflamatório favorável para a entrada e sobrevivência de micobactérias (Moura *et al.* 2012).

In vitro, a IL-10 diferencia macrófagos humanos para um perfil imunossupressor aumentando a expressão de CD163, em contraste, o tratamento de monócitos com IL-15 induz a expressão de CD40, CD16, CD64 e CD14. Esses fenótipos foram relacionados a diferentes mecanismos de resposta imune, macrófagos CD163+ mostraram aumento na capacidade endocítica e fagocítica quando comparados com macrófagos induzidos pela IL-15, por outro lado, os macrófagos induzidos pela IL-15 demonstraram maior capacidade de destruir micobactérias intracelulares por mecanismo dependente de vitamina D. Macrófagos CD163+ foram encontrados em lesões de pele de pacientes LL e estavam ausentes em lesões de pacientes TT indicando que pode haver divergências na capacidade fagocítica e microbicida de macrófagos na hanseníase e essa polarização pode

prejudicar o controle micobacteriano aumentando assim a susceptibilidade dos pacientes LL na hanseníase (Montoya *et al.* 2009).

Os neutrófilos são células que apresentam alta plasticidade e estão envolvidas em diversas patologias. Fridlender *et al.* 2009, descreveram a polarização de neutrófilos em dois tipos distintos como neutrófilos N1 e N2. Os neutrófilos N1 apresentam perfil pró-inflamatório, núcleo hipersegmentado, aumento da citotoxicidade, alta expressão de ICAM-1 e produção de citocinas inflamatórias. Por outro lado, neutrófilos com fenótipo N2 apresentam um perfil anti-inflamatório e pró-tumoral além de demonstrar capacidade pró-angiogênica sendo capaz de produzir níveis elevados de MMP9.

Em hanseníase, já foi visto neutrófilos circulantes carregados de bacilos em pacientes LL não tratados (Drutz *et al.* 1972). Além disso, neutrófilos de doadores saudáveis respondem ao estímulo *in vitro* com *M. leprae* e frações do bacilo produzindo IL-8 e TNF e neutrófilos de pacientes ENH exibem apoptose acelerada *in vitro* (Oliveira *et al.* 1999).

Recentemente, nosso grupo mostrou que durante o ENH os pacientes exibem aumento de neutrófilos circulantes que expressam CD64 e infiltrado neutrofílico nas lesões de pele. A expressão de CD64 nesses neutrófilos foi correlacionada com a gravidade do episódio reacional (Schmitz *et al.* 2016).

da Silva *et al.*, 2019 mostraram que neutrófilos de pacientes ENH exibem liberação espontânea de armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês, *neutrophil extracellular traps* - NETs) em cultura *ex vivo*. Além disso, biópsias de lesão de pele desses pacientes apresentaram características compatíveis com netose e esse achado não pode ser encontrado após sete dias de tratamento com a talidomida ou em pacientes MB não reacionais.

Tavares 2019, caracterizou uma subpopulação de neutrófilos de baixa densidade (do inglês, *low density* - LDN) em amostras de sangue de pacientes com hanseníase. Neutrófilos LDN de pacientes ENH apresentaram aumento na expressão de CD11b, CD16, CD66 e diminuição de CD62L e CD49d quando comparados a LDN de pacientes do polo MB não reacionais.

De que maneira a participação de neutrófilos contribui para a imunopatogênese da hanseníase ainda não foi elucidado, o estudo dessas células vem sendo negligenciado e existem poucos trabalhos na literatura que abordam esse tema (Schmitz *et al.* 2019) e até o momento não existem trabalhos que abordem a resposta de neutrófilos em pacientes não reacionais da hanseníase.

Na figura 1.1.7-1 apresentamos um resumo proposto para explicar de maneira geral, o desenvolvimento da resposta imunológica nos polos da hanseníase.

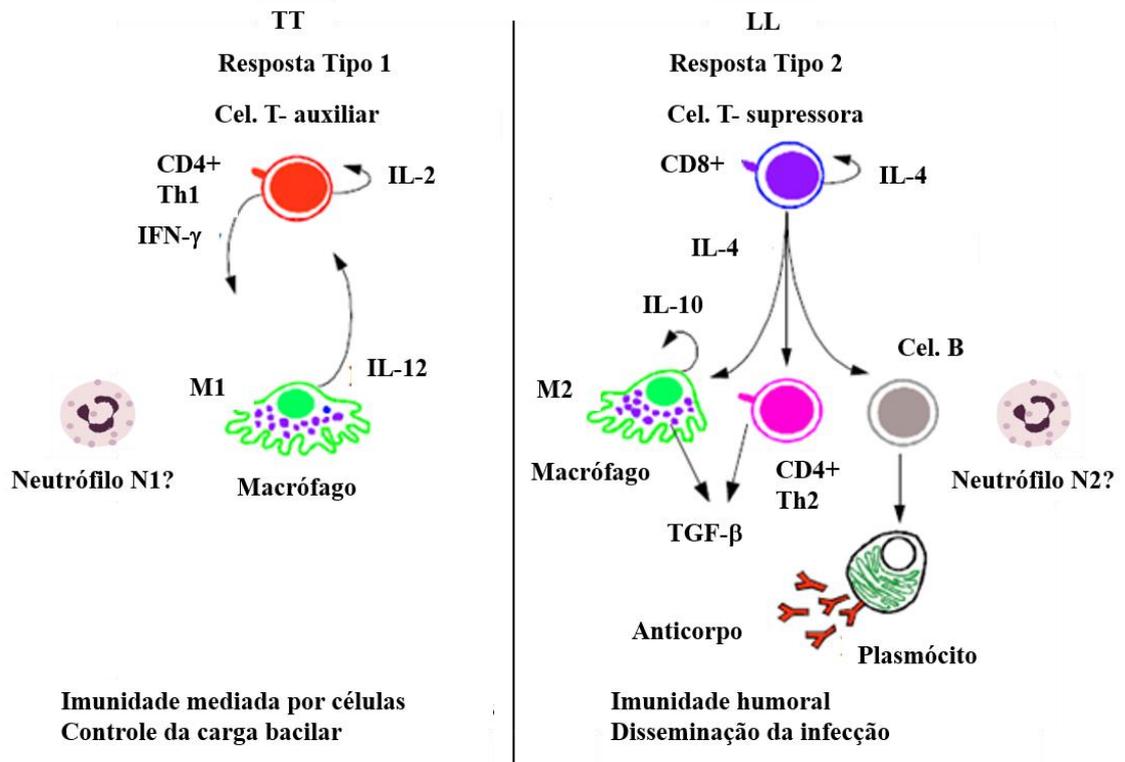


Figura 1.1.7-1 Paradigma da resposta imunológica desenvolvida pelo hospedeiro durante o curso da infecção pelo *M. leprae*. Pacientes TT apresentam perfil de resposta do tipo 1 onde a produção de IL-2 leva a diferenciação de linfócitos TCD4+ para Th1 com alta produção de IFN- γ . O IFN- γ ativa macrófagos com perfil M1 que produzem IL-12 e potencializam a resposta do tipo celular culminando no controle da carga bacilar. Pacientes LL desenvolvem resposta do tipo 2 com ativação de um perfil de resposta de células TCD8 reguladoras que produzem IL-4. A IL-4 leva a ativação de linfócitos B, células Th2 e induz a produção de IL-10 e TGF- β por mácrofagos com perfil M2. A ativação de linfócitos B leva a alta produção de anticorpos contra o *M. leprae*, mas o perfil de citocinas cria um ambiente imunossupressor que contribui para a disseminação da infecção. Ainda não se sabe sobre a polarização de neutrófilos na hanseníase. Esquema modificado de Goulart *et al.* 2002.

1.2 Interleucina – 33

1.2.1 Caracterização

A IL-33 foi descrita pela primeira vez em 1999 como uma proteína (DV27) superexpressa em artérias cerebrais vasoespásticas em modelo de hemorragia subaracnóide canina (Onda *et al.* 1999). Em 2003, foi caracterizada a nível molecular

como um fator nuclear, expresso por células endoteliais humanas e em 2005 foram descritos os mecanismos mediadores de seus efeitos, assim como foi nomeada de IL-33 e adicionada à família de citocinas IL-1 (Baekkevold *et al.* 2003, Schmitz *et al.* 2005).

A IL-33 é localizada no cromossomo 9p24.1 em humanos e é expressa como um polipeptídeo contendo pró-domínio, pode ser detectada em diversos tecidos, mas sua produção é restrita a algumas células como em células epiteliais, endoteliais e em queratinócitos e fibroblastos estimulados com TNF. *In vitro*, o estímulo com caspase-1 é capaz de clivar a forma pró formada em IL-33 madura (Schmitz *et al.* 2005). Entretanto, foi visto que a clivagem dessa citocina por caspase-1 leva a inativação dessa citocina, além disso, o grupo mostrou que a IL-33 pró-formada é capaz de ativar o seu receptor independente de clivagem (Cayrol *et al.* 2009).

Diferente da maioria das citocinas que geralmente são ativamente secretadas, a IL-33 é uma citocina nuclear que é liberada durante a necrose celular ou quando os tecidos são danificados (Cayrol *et al.* 2009). A produção seletiva dessa citocina pode sugerir que ela haja como uma alarmina tecidual que alerta o sistema imunológico sobre danos endoteliais ou epiteliais durante infecções, estresse físico, traumas ou processos alérgicos (Haraldsen *et al.* 2009, Chan *et al.* 2019).

Essa citocina exerce sua atividade biológica exclusivamente através da ligação com seu receptor ST-2, que é dependente tanto do co-receptor da proteína acessória do receptor IL-1 (IL-1RAcP) como da proteína adaptadora MyD88 (Martin 2013). O gene responsável por codificar ST-2, o produz como proteína transmembranar assim como em forma solúvel (sST-2) que atua como um receptor *decoy* ou “chamariz”, controlando os níveis dessa citocina durante respostas inflamatórias (Hayakawa *et al.* 2007).

O ST-2 de membrana é expresso em diversos tipos celulares como mastócitos, macrófagos, linfócitos inatos (ILC), linfócitos T reguladores (Treg) e Th, eosinófilos, basófilos e neutrófilos (Afferni *et al.* 2018, Chan *et al.* 2019).

Outro importante aspecto funcional dessa citocina é a capacidade de iniciar o remodelamento vascular durante a hipóxia como foi mostrado por Liu *et al.* 2018. Nesse trabalho, o grupo mostrou em modelo de hipóxia pulmonar induzida que houve aumento de IL-33 e ST-2 no tecido pulmonar de camundongos durante a hipóxia seguida da formação de novos vasos e o bloqueio de ST-2 levou a fibrose tecidual, além disso, resultados semelhantes foram obtidos *in vitro* em cultura de células endoteliais humanas.

1.2.2 Polarização de resposta imunológica

A IL-33 desempenha um papel importante na polarização de respostas imunes do tipo 2. A imunidade do tipo 2 está envolvida em processos alérgicos e infecciosos e é caracterizada pela produção de citocinas conhecidamente com perfil Th2 como a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13. Em modelo experimental, a IL-33 é capaz de induzir a proliferação de ILC-2 e essas células produzem grandes quantidades de citocinas do tipo Th2 (Moro *et al.* 2010, Neill *et al.* 2010, Cayrol *et al.* 2014).

Além da polarização de resposta de ILCs, a IL-33 também promove a polarização de macrófagos para um perfil M2 em modelo de infecção viral associada à doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) de camundongos. Nesse trabalho, o grupo observou que a polarização de M2, levou ao aumento na produção de IL-13 e conseqüentemente produção de muco e hiper-reatividade característicos dessa doença. Além disso, conseguiram detectar células produtoras de IL-33 em biópsias pulmonares de pacientes com DPOC e esse achado foi correlacionado positivamente com a expressão gênica aumentada de IL-13 e mucina (Byers *et al.* 2013).

As células Th virgens expressam de maneira constitutiva o ST-2 e o estímulo com a IL-33 induz a polarização para células Th2 além de induzir a proliferação de Treg *in vitro* (Afferni *et al.* 2018).

Neutrófilos estimulados com IL-33 apresentam um perfil de secreção de citocinas Th2, com altos níveis de IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e exibem um perfil de expressão gênica distinto de neutrófilos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS). Essa subpopulação de neutrófilos induzidos por IL-33 foi caracterizado fenotipicamente por aumento da expressão de algumas moléculas de superfície como os receptores de quimiocinas (CXC) 1 e 2 e IL-1R2, e aumento na produção de citocinas com perfil anti-inflamatório como por exemplo a IL-10 (Sun *et al.* 2018). Além disso, Alves-Filho *et al.* 2010, demonstraram que o tratamento de camundongos com IL-33 em modelo de sepse levou ao aumento no influxo de neutrófilos mediados por CXCR2 para o sítio de infecção, diminuindo assim a inflamação sistêmica causada pela sepse.

Em modelo experimental de hepatite viral em camundongos, Liang *et al.* 2018, demonstraram que a IL-33 promove o recrutamento de neutrófilos com perfil imunossupressor para o fígado. Esses neutrófilos exibiram alta expressão de arginase-1 e capacidade de inibir a proliferação de linfócitos TCD8+ *in vitro* e esse mecanismo foi associado a produção de IL-13 por ILC-2.

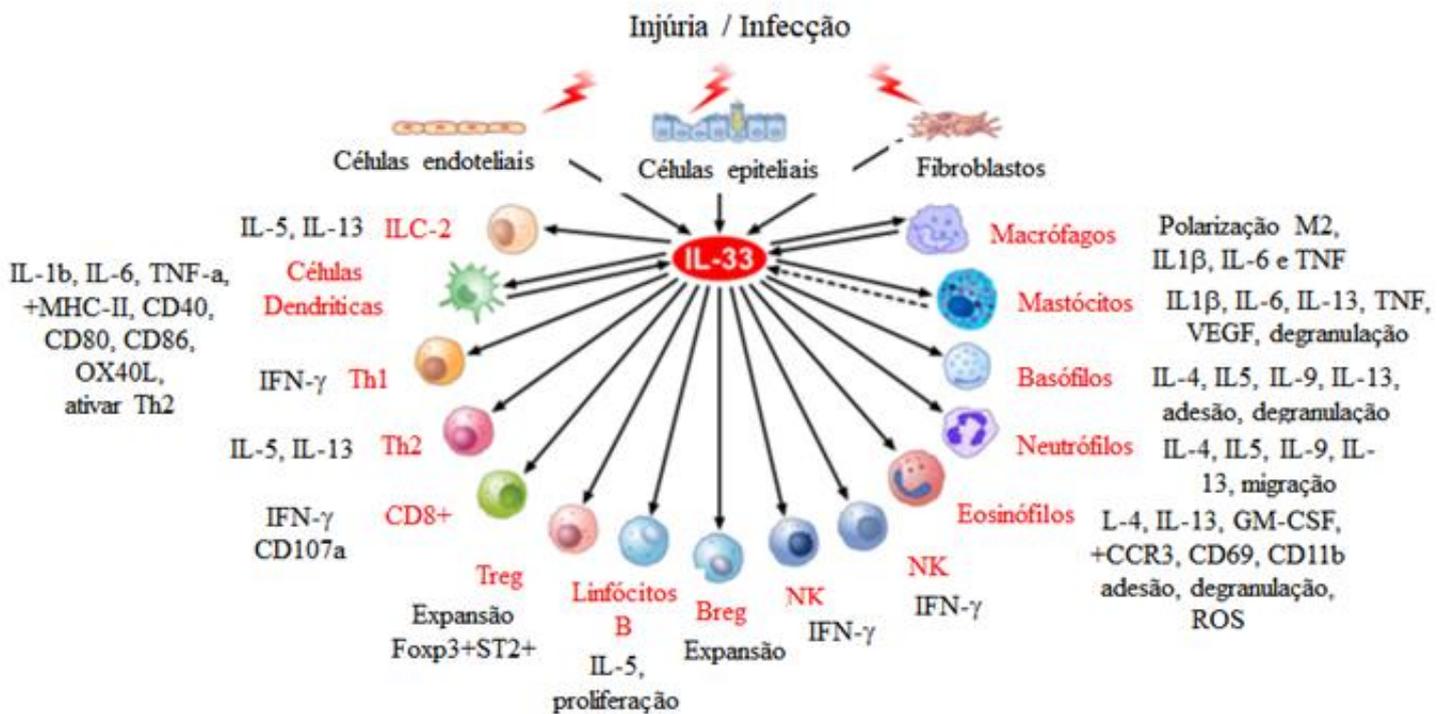


Figura 1.2.2-1 Rede de comunicação celular induzida por IL-33. Após injúria ou infecção, células endoteliais, epiteliais e/ou fibroblastos liberam IL-33. A IL-33 atua em diferentes tipos celulares, principalmente na polarização de resposta do tipo 2 como por exemplo, linfócitos Th2, ILC-2 e macrófagos M2. Além disso, induz a produção de citocinas do tipo 2 em Mastócitos, Basófilos, Neutrófilos e Eosinófilos, contribuindo com a expansão de linfócitos B. Adaptado de Afferni *et al.* 2018.

Na hanseníase já foi descrito que a polarização da resposta imunológica depende da interação entre hospedeiro e *M. leprae*, entretanto pouco se sabe sobre o envolvimento da IL-33 na imunopatogênese da doença, tampouco sobre a polarização de neutrófilos na hanseníase.

Nesse contexto, nossa hipótese é que o dano tecidual causado em pacientes MB e durante o ENH leva a liberação exacerbada de IL-33, e que essa citocina contribua diretamente na polarização da resposta imunológica para um perfil do tipo 2 incluindo a polarização de neutrófilos para um perfil N2.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar mecanismos moleculares envolvidos no recrutamento e polarização de neutrófilos durante a hanseníase.

2.2 Objetivos específicos

- 2.2.1 Avaliar os níveis séricos de IL-33 em pacientes com hanseníase
- 2.2.2 Avaliar os níveis séricos de sST2 em pacientes hansenianos
- 2.2.3 Correlacionar os níveis séricos de IL-33 com sST2
- 2.2.4 Avaliar a produção de IL-33 e ST-2 em lesões de pele de pacientes multibacilares *versus* paucibacilares
- 2.2.5 Comparar a expressão de CD11b, CD62L, CD49d e CXCR2 em neutrófilos circulantes de pacientes com hanseníase.
- 2.2.6 Avaliar a expressão de IL-8 em lesões de pele de pacientes durante o ENH e após 7 dias de tratamento com talidomida

3 Material e Métodos

3.1 Desenho experimental, população de estudo e considerações éticas - Os pacientes com hanseníase foram diagnosticados e classificados de acordo com os critérios estabelecidos por Ridley e Jopling (1966) e acompanhados no Ambulatório Souza Araújo - Centro de referência em diagnóstico e tratamento de hanseníase, unidade clínica do Laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) - FIOCRUZ, no Estado do Rio de Janeiro, área endêmica para hanseníase.

Todos os pacientes foram submetidos à avaliação clínica e dermatológica e receberam tratamento preconizado pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Após a confirmação do diagnóstico, os pacientes foram convidados a participar desse trabalho e receberam um termo de consentimento livre e esclarecido. Após assinatura do termo, amostras de sangue e pele foram coletadas antes do início do tratamento.

Critérios de inclusão no estudo: Pacientes com diagnóstico de hanseníase, maiores de 18 anos, antes do início do tratamento.

Critérios de exclusão: Pacientes com comorbidades infecciosas ou doenças crônicas (coinfecção pelo vírus HIV, diabetes, câncer), gravidez, imunossupressão, dependentes químicos e utilizando qualquer medicação no momento do diagnóstico.

Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Instituto Oswaldo Cruz (CAAE 56113716.5.0000.5248).

Tabela 3.1-1: Características básicas dos pacientes incluídos no estudo.

Características	MB	PB	RR	ENH	ENH Tal
Média da idade (min - máx)	44,3 (22-83)	54,2 (31-76)	49,8 (25-75)	43,7 (18-76)	36,6 (21-69)
Sexo	M = 12 H = 26	M = 15 H = 12	M = 10 H = 12	M = 7 H = 33	M = 2 H = 28
Média de IB (min - máx)	4,07 (1,75- 5,9)	0	0,51 (0 – 4,5)	3,36 (0,5 – 4,75)	--
Média de ILB (min - máx)	4,18 (2,5 – 5,9)	0	0,52 (0 – 3,4)	3,46 (0 – 4,95)	--
Dosagem dos níveis séricos de IL-33	N = 23	N = 16	N = 21	N = 35	N = 13
Western blotting	N = 5	N = 4	--	--	--
Dosagem dos níveis séricos de sST-2	N = 18	N = 17	N = 6	N = 18	--
Citometria	N = 5	N = 4	--	N = 4	N = 4
Expressão gênica de CXCL8	--	--	--	N = 9	N = 9
Total de pacientes	36	27	22	40	30

Legenda: MB = Multibacilares, PB = Paucibacilares, RR = Reação Reversa, ENH = Eritema Nodoso Hanseniano, M = Mulher, H = Homem, IB = Índice baciloscópico, ILB = Índice Baciloscópico da Lesão.

3.2 Coleta e Processamento de Sangue - A manipulação do material biológico foi realizada na câmara de fluxo laminar em ambiente estéril, respeitando as normas de precauções para a manipulação de material biológico (Marques 2017). O sangue coletado em tubo sem anticoagulante foi centrifugado para a obtenção do soro que posteriormente foi utilizado para a dosagem de IL-33 e sST2.

3.3 Dosagem de IL-33 e sST-2 – As dosagens dos níveis séricos de IL-33 e ST-2 solúvel foram realizadas através de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando kit *Human IL-33 Standard ABTS* (PeproTech) e *Human ST2/IL-33R DuoSet* (R&D system). Ambos foram processados de acordo com as especificações dos fabricantes. Resumidamente, placas de 96 poços de ELISA foram revestidas com 50µL de anticorpos de captura anti-IL-33 ou anti-sST2 e mantidas na geladeira por 18 horas. Após lavagem das placas com tampão indicado pelo fabricante, foi feito bloqueio da placa com 1% de albumina sérica bovina (BSA) em tampão fosfato (PBS) por 1h seguido de nova lavagem e adição de 50 µL dos soros nos poços destinados as amostras. Em paralelo, IL-33 ou sST2 recombinante foi adicionada aos poços para geração da curva-padrão. O tempo de incubação foi de 2 horas em temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem, adicionamos o anticorpo de detecção biotilado anti- IL-33 ou sST2. A reação foi revelada por Streptavidina-peroxidase e o substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) até que a curva atingisse a coloração indicada. A reação foi finalizada com adição de HCL 1 N nos poços. A placa foi lida no leitor de ELISA (Spectra Max 190/ Molecular Devices) no comprimento de onda 405 nm. A análise da curva-padrão e a obtenção dos valores das citocinas foram realizados no programa SoftMax Pro 5.3 (Molecular Devices). Este ensaio detecta IL-33 ou sST-2 total, tanto na sua forma ativa quanto na pró formada. O limite de detecção mínimo do kit é 31,2 pg/mL para IL-33 e 31,3 pg/mL para sST-2.

3.4 Purificação de neutrófilos de sangue periférico - O sangue periférico heparinizado foi diluído 1:1 em PBS para separação das células por gradiente de densidade em Ficoll Hypaque (GE Healthcare, Suécia). Após centrifugação a 900 xg, sem freio, à 25°C, por 30 minutos, houve separação de células com 3 perfis de densidade distintos. Na fração de células vermelhas obtida após a centrifugação, foi acrescentado 45 mL de solução de lise de hemácias 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 neutrófilos foi lavado em PBS (1500 rpm, por 10 minutos, a 4°C) e ressuspenso em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e penicilina-estreptomicina (Sigma). Uma pequena alíquota dessa suspensão celular foi diluída em azul de Trypan (1:20) (Bio WHITTAKER, EUA) e avaliada em câmara de Neubauer, para a estimativa da concentração de células viáveis.

3.5 Citometria de fluxo multiparamétrica – Os neutrófilos (1×10^6 células por tubo) foram centrifugados a 400 xg por 5 minutos a 4°C em tampão PBS. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuscitado em 10 µL de solução de bloqueio (PBS/BSA 1% + 5% Soro Humano Inativado) por 30 minutos. Passada a etapa de bloqueio, foi adicionado o tampão de lavagem (PBS/BSA 1%), seguido de marcação utilizando os anticorpos descritos na tabela 3.5-1, em volume final de 50 µL. As amostras foram incubadas por 30 minutos à 4° C, protegidas de luz. Passado o período de incubação, as células foram lavadas em 200 µL de tampão de lavagem, seguido de descarte do sobrenadante e fixação em Paraformaldeído (PFA) 4% durante 10 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas novamente e o *pellet* foi ressuscitado em 200 µL de tampão de lavagem. As amostras foram armazenadas e protegidas da luz e mantidas a temperatura de 4°C até o momento da leitura. Para a leitura das amostras foi utilizado o citômetro BD FACSAria (BD Biosciences) da Plataforma Tecnológica da Fiocruz/IOC. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra dentro da região de granulócitos utilizando os parâmetros *Side Scatter* (SSC) x *Forward Scatter* (FSC). Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo (BD Systems, USA).

Tabela 3.5-1 Descrição dos anticorpos utilizados na citometria. São apresentados o código do produto no catálogo seguido de empresa fornecedora.

Anticorpos	Catálogo e empresa
CD16	#302028 Biolegend
CD11B	#301306 Biolegend
CD49D	#563458 BD Horizon
CD62L	#14062973 eBioscience
CXCR2	#320714 Biolegend

3.6 Avaliação do grau de pureza das preparações de neutrófilos - Para a preparação de lâminas em cytospin, amostras contendo 1×10^5 de células que foram separadas através

do processamento por Ficoll foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de Penicilina-Estreptovidina. 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 confirmação do grau de pureza também foi realizada por citometria, através da marcação das células com anticorpo anti-CD16. A aquisição das amostras foi feita pelo citômetro Accuri (BD Bioscience) e as análises foram realizadas pelo programa FlowJo.

3.7 Extração de RNA e RTqPCR - O RNA total foi extraído de amostras de lesões de pele congeladas utilizando TRIzol (Life Technologies) conforme as instruções do fabricante. O processamento foi realizado com 50mg de tecido para 1 mL de TRIzol® e submetidos a um homogenizador de tecidos (Polytron® PT-3100D Kinematica AG). Em seguida, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada tubo de 1,5 mL, livre de DNase/RNase, depois foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12.000 xg por 15 min a 4° C. A fase aquosa contendo o RNA foi recolhida e a fase orgânica estocada para posterior extração de proteínas. À fase aquosa foram adicionados 500 µL de isopropanol (SigmaAldrich, USA), e posteriormente foram misturados por inversão e incubados a -70° C, por 30 minutos para precipitação do RNA. Após o período de incubação, os tubos foram mantidos por 10 minutos em temperatura ambiente, e foi adicionado 1 µL de GlycoBlue (Ambion), para marcação do ácido nucleico e então centrifugados a 12.000 xg por 20 min a 4° C. Os sobrenadantes foram descartados e o material sedimentado lavado com 1 mL de etanol 75% através de centrifugação a 7.500 xg por 5 min a 4° C. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 30 min e, posteriormente, ressuspensos em 10 µL de água destilada ultrapura, livre de DNase/RNase (Life Technologies, USA) em seguida as amostras foram estocadas a -70° C para análises posteriores. As amostras de RNA foram tratadas com DNase para evitar possível contaminação com DNA genômico (Kit RTS DNase, MO BIO Laboratories, CA, EUA). O RNA foi então submetido à análise de pureza e quantificação em espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) e integridade por eletroforese em gel de agarose 1,2% (UltraPure agarose, Life Technologies). 1 µg de RNA

de cada amostra foi reversamente transcrito utilizando o kit “SuperScript III First-Strand Synthesis System” (Life Technologies) de acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram conduzidas usando duplicatas técnicas de 10 ng de cDNA.

As reações foram incubadas no equipamento de PCR em tempo real StepOnePlus® (Applied Biosystems, EUA), e submetidas a ciclos de 95° C por 20 segundos, para ativação da DNA polimerase, 40 ciclos de 95° C por 1 segundo, para a desnaturação da fita, e 60° C por 20 segundos para o anelamento dos primers e extensão da fita de cDNA, utilizando o “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems, MA, EUA). Ao final da reação de amplificação, as amostras foram submetidas a uma nova incubação para geração da curva de dissociação, onde se determina o ponto correspondente à temperatura de dissociação dos oligonucleotídeos de suas sequências alvo. Dessa forma, a curva de “melting” foi feita de modo contínuo a 95° C por 15 s e 60° C por 1 minuto. A análise de expressão gênica foi realizada no software Expression Suite através do método do $2^{-\Delta CT}$, onde ΔCT é igual ao CT (“cycle threshold”) do gene de interesse subtraído do CT do gene de referência, utilizando como normalizador o gene de referência *GAPDH* (Hs02758991_g1, ThermoFisher Scientific).

3.8 Extração e quantificação de proteínas de biópsias de pele - As lesões de pele obtidas de biópsias foram processadas para extração de proteínas de acordo com o protocolo para extração de proteínas pelo método do TRIzol®. Foi adicionado o reagente Trizol às biópsias e a fase de fenol-etanol resultante após a extração de RNA e DNA foi submetida a diálise com 0,1% de Dodecil sulfato de sódio a 4°C por 24 horas, com três lavagens, a primeira com 16 horas, a segunda a 20 horas e a última a 22 horas seguidas por centrifugação a 6000 xg por 20 minutos a temperatura ambiente. Após esse procedimento, a massa globular (visível) de cada amostra foi coletada, transferida para um tubo novo e centrifugada por 20 minutos a 6000 x g a 4° C. Em seguida o *pellet* foi ressuspenso e homogeneizado em 100 µl de solução de Tris - HCl 1M, uréia 8 M, pH 8, até sua dissolução completa. Em seguida, a quantidade de proteína nas amostras foi dosada pelo método de Bradford, utilizando o reagente Pierce Comassie (Thermo Fisher Scientific), seguindo as recomendações do fabricante. Para elaboração da curva padrão foi utilizada BSA diluído em PBS, variando entre 0,1 - 1,4 mg / mL. Em uma microplaca de 96 poços de fundo plano (Greiner Bio-one, Brasil) foi aplicada a curva padrão (diluição seriada: 0,1 µg / µL a 1 µg / µL), água destilada como branco (10 µL / poço), e as amostras diluídas 10 x (1 µL / poço de amostra e 9 / poço µL de H₂O). Em seguida, em cada poço,

foram adicionados 200 μ L do reagente Bradford e a placa foi submetida a homogeneização em um agitador por aproximadamente 30 segundos. As amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos e a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 595 nm. Os resultados foram analisados pelo software SoftMax® data acquisition and analysis (Molecular Devices, USA).

3.9 Western Blotting - O volume equivalente a 20 μ g de proteína por amostra foi reservado em um novo tubo e a ele foi adicionado tampão de amostra 4x (Tris-HCl pH 6,8 240 mM, glicerol 40%, β - mercaptoetanol 5%, SDS 8%, azul de bromofenol 0,08%) em volume suficiente para ficar com a concentração final de 1x. As amostras foram fervidas por 5 minutos e aplicadas em um gel de poliacrilamida 12%. Paralelamente, foi aplicado o padrão de peso molecular pré-corado PageRuler (Thermo Fisher Scientific) para então realização do SDS-PAGE. A corrida foi realizada em equipamento MiniProtean (BIO-RAD) utilizando o tampão de corrida composto por Tris-base 25mM, glicina 192 mM e 0,1% de SDS e a voltagem foi fixada em 100 V por 1 hora e 30 minutos. Ao término da corrida, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (G.E. Healthcare LifeSciences) em tampão composto por Tris-base 25mM, glicina 192 mM e 20% de etanol a 100 V por 1 hora. Ao final da transferência, a membrana foi corada com Amido Black, para visualização das proteínas e verificação da eficiência da transferência, em seguida, prosseguimos com o *western blotting*.

A membrana foi bloqueada por 2 horas em 5% de BSA (albumina do soro bovino) em TBS-T (*Tris buffered saline- tween*, composto por Tris-HCl 20mM pH 8,0; NaCl 150 μ M e 0,1 % Tween 20), em seguida a membrana foi incubada *overnight* com um dos anticorpos descritos na tabela 3.8-1. Após o período de incubação, a membrana foi lavada com TBS-T durante 10 minutos em agitação moderada, repetindo o processo mais 2 vezes. Após essa etapa a membrana foi incubada com o anticorpo secundário conjugado a enzima peroxidase (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:10.000 por 1 hora. Após incubação, foram realizadas mais 3 lavagens, conforme já descrito e então a membrana foi posicionada no cassete de revelação por quimioluminescência, utilizando o Kit Amersham ECL Western Blotting (G.E. Healthcare LifeSciences), que contém o substrato, aplicado diretamente sobre a membrana. A revelação foi realizada na câmara escura, através da exposição do filme radiográfico Amersham Hyperfilm ECL (G.E. Healthcare LifeSciences) à membrana e então revelação do filme utilizando as soluções reveladora (Kodak) e fixadora (Kodak).

Tabela 3.9 Descrição dos anticorpos usados para o western blotting.

Anticorpos	Catálogo e empresa
GAPDH	#SC32233 Santa Cruz
Anti- IL-33	#AF3625 R&D Systems
Anti- ST2/IL-33R	#AF523 R&D Systems
Anti-mouse IgG conjugado a HRP	#31430 ThermoFisher
Anti-goat IgG conjugado a HRP	# HAF109 R&D Systems

3.10 Análise estatística - As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM versão 6 (GraphPad Software, USA). Realizamos primeiro um teste de normalidade. Para comparar os resultados de dois grupos foi utilizado o teste Mann-Whitney não pareado. 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, a depender da distribuição dos dados. As diferenças foram consideradas significativas se $p < 0,05$.

4 Resultados

4.1 Detecção de níveis séricos de IL-33 em pacientes com hanseníase

Para avaliar os níveis séricos de IL-33 realizamos o ensaio de ELISA em amostras de pacientes com hanseníase e os resultados serão apresentados na forma de média \pm erro padrão. Observamos que os níveis séricos de IL-33 foram cerca de 80 vezes maior nos pacientes MB quando comparados com pacientes PB ($2668 \pm 565,1$ e $33,52 \pm 15,49$, respectivamente. $p < 0,0001$) (Fig 4.1.1-A).

Em seguida, fomos avaliar a capacidade discriminatória dessa citocina em classificar a forma clínica desses pacientes através de análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*), pois essa análise permite a definição de sensibilidade e especificidade utilizadas para técnicas de diagnóstico. Nossa análise revelou que a IL-33 apresentou 100% de sensibilidade e especificidade para distinguir entre MB e PB e conseguimos determinar o valor de *cut-off* em 79,64 pg/mL (Figura 4.1.1 - B).

Os níveis de IL-33 foram variáveis dentro do grupo de pacientes MB e a análise de correlação entre os níveis de IL-33 e o índice baciloscópico revelou que houve correlação positiva entre eles - Correlação de Spearman $r = 0,78$, $p < 0,0001$ (Figura 4.1.1-C).

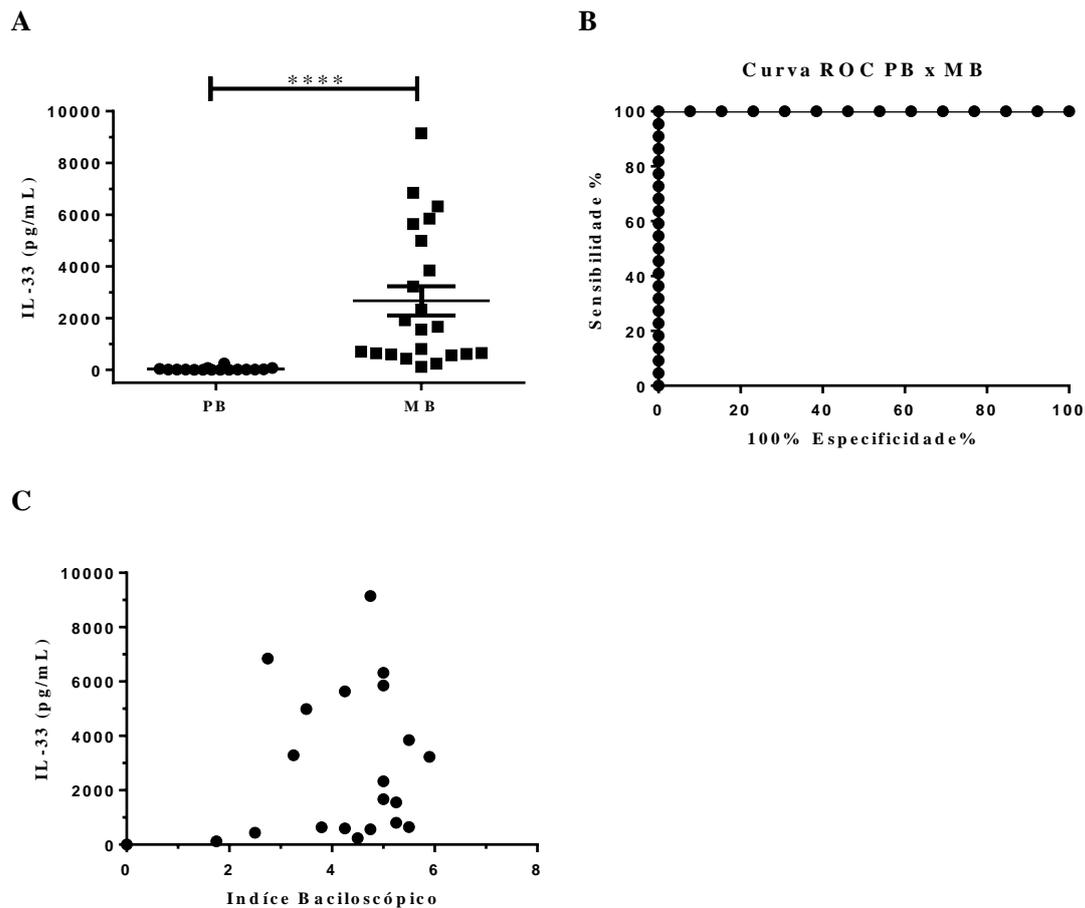


Figura 4.1.1 IL-33 como potencial biomarcador de hanseníase multibacilar. A) a concentração de IL-33 foi quantificada por ensaio imunoenzimático ELISA, em soro de pacientes PB (n = 16) e MB (n = 23). A barra representa média \pm erro padrão. Teste de Mann-Whitney **** $p < 0,0001$. B) Curva de ROC representativa para sensibilidade e especificidade, comparando os níveis séricos de IL-33 entre pacientes PB x MB. C) Correlação entre os níveis séricos de IL-33 e o índice baciloscópico de pacientes PB e MB. Correlação de Spearman $r = 0,78$, $p < 0,0001$.

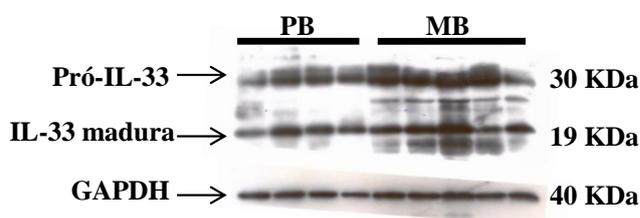
O grupo de pacientes MB apresentou variação nos níveis de IL-33, entretanto essa variação não foi dependente do diagnóstico clínico desses pacientes, como mostrados na tabela 4.1.1

Tabela 4.1.1 Níveis séricos de IL-33 em pacientes com hanseníase MB

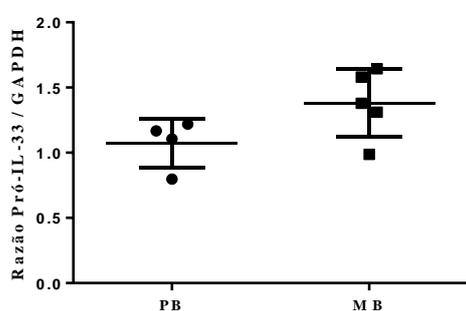
Paciente	Forma clínica	Níveis séricos de IL-33
#223	LL	119,179
#224	LL	705,454
#16	LL	6324,242
#12	LL	5637,956
#187	LL	1556,940
#188	LL	2331,550
#157	LL	647,073
#146	LL	1666,742
#165	LL	9144,241
#179	LL	3226,956
#156	LL	3843,980
#204	BL	595,080
#2	LL	564,560
#5	LL	803,880
#171	LL	5851,690
#202	LL	6844,117
# 200	BL	638,293
#149	LL	4988,042
#150	LL	237,507
#205	LL	433,754

A produção de IL-33 foi confirmada em biópsias de lesão de pele de pacientes PB e MB. Como mostrado na figura na figura 4.1.2, nossas análises de *Western Blotting* revelaram que houve produção de IL-33 tanto na sua forma madura (média de $0,9022 \pm 0,1021$ para PB e $1,231 \pm 0,1014$ para pacientes MB), como da forma pró-IL-33 ($1,073 \pm 0,09466$ pacientes PB e $1,381 \pm 0,1160$ para pacientes MB) (Figura 4.1.2 – A - C).

A



B



C

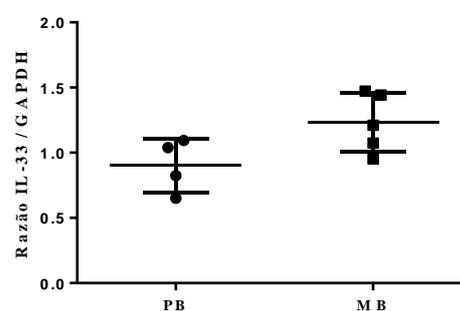


Figura 4.1.2 Biópsias de pele de pacientes com hanseníase apresentam tanto pró-IL-33 como IL-33 madura. Os níveis proteicos de IL-33 foram obtidos de fragmentos de lesões de pele de pacientes PB (n = 4) e MB (n = 5) e analisados por *Western blot* usando anticorpo específico para IL-33 e como controle usamos o GAPDH. B) Gráfico da razão Pró IL-33/ GAPDH. C) Gráfico da razão IL-33 madura/ GAPDH. Barra representa média \pm erro padrão.

Cerca de 40% dos pacientes com hanseníase, desenvolvem reações que interrompem a cronicidade da doença (Rydley *et al.* 1966, Brito *et al.* 2008). Nesse contexto, fomos avaliar os níveis séricos de IL-33 no soro dos pacientes no momento de diagnóstico clínico de episódios reacionais do tipo 1 (RR) ou do tipo 2 (ENH). Os dados obtidos são mostrados na figura 4.1.3 - A. De fato, a IL-33 foi detectada em todos os grupos da hanseníase, porém em quantidades variáveis dependendo da forma clínica dos pacientes. Pacientes MB exibiram níveis mais elevados dessa citocina, chegando a cerca de 2 vezes maior quando comparados a pacientes ENH ($2668 \pm 565,1$ e $1063 \pm 155,1$ respectivamente). Vale destacar que tanto pacientes MB quanto ENH apresentaram níveis séricos de IL-33 significativamente maiores que pacientes RR ($252,7 \pm 70,97$ p < 0,0001 quando comparamos pacientes MB versus RR p < 0,001 quando comparamos pacientes ENH versus RR) (figura 4.1.3 - A).

O tratamento para o ENH, geralmente é feito com uso da Talidomida, mas o mecanismo de ação desse fármaco ainda não foi completamente desvendado (Millrine *et al.* 2017). Com o intuito de verificar se a Talidomida modula os níveis séricos da IL-33, nós dosamos essa citocina no soro dos pacientes após 7 dias de tratamento que é quando os pacientes apresentam melhoras significativas na sua condição clínica (Schmitz *et al.* 2016). Os níveis séricos dessa citocina aumentaram cerca de 3 vezes após o tratamento com a Talidomida ($1063 \pm 155,1$ e 3547 ± 1518 antes e após o tratamento, respectivamente) (Figura 4.1.3- A). Nós conseguimos ainda, parear os resultados de 8 pacientes com ENH antes e depois do tratamento com a Talidomida, destes, 4 apresentaram aumento nos níveis dessa citocina após o tratamento enquanto que os outros 4 apresentaram diminuição nos níveis dessa citocina (Figura 4.1.3 - B).

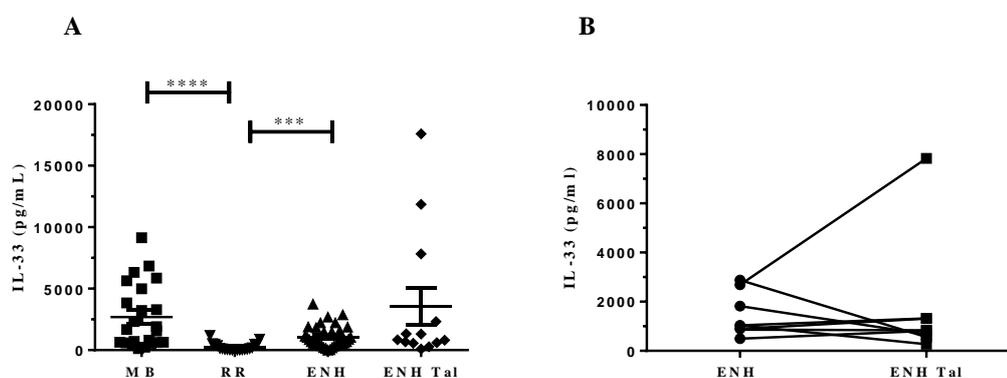


Figura 4.1.3 Os níveis séricos de IL-33 são aumentados em pacientes MB e pacientes durante o ENH quando comparados a pacientes com RR. A) Foram avaliados 23 pacientes MB, 21 RR e 35 ENH. Cada ponto representa 1 paciente. Barra representa média \pm erro padrão. Teste de Kruskal-Wallis com teste de múltipla comparação de Dunn **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$. B) Acompanhamento longitudinal dos pacientes ENH após 7 dias de tratamento com a talidomida. Cada linha representa um único paciente antes e após o tratamento.

Sabe-se que cerca de 50% dos pacientes LL (MB) desenvolvem reação do tipo ENH que podem ocorrer antes, durante ou após o início do tratamento com a PQT (Walker *et al.* 2015). Sendo assim, cogitamos a hipótese de que os níveis elevados de IL-33 nesse grupo, poderiam pré-dispor esses pacientes a desenvolverem o ENH. Nossos resultados mostraram que 8 pacientes MB desenvolveram ENH em um momento posterior ao diagnóstico de hanseníase porém, os níveis séricos dessa citocina foram variáveis, quatro pacientes exibiram níveis acima da média para o grupo, enquanto outros

quatro ficaram abaixo da média, sugerindo assim que os níveis séricos de IL-33 nos pacientes MB não foi um fator preditivo para o desenvolvimento de ENH. Entretanto, quando analisamos a média do grupo de pacientes que desenvolveram ENH, observamos níveis séricos dessa citocina com média de 3409 ± 1049 enquanto que a média para pacientes MB que não desenvolveram ENH foi de $2245 \pm 658,8$ (Tabela 4.1-2). É importante ressaltar que os pacientes MB incluídos no estudo foram acompanhados até o momento da conclusão desse trabalho e não se pode prever se desenvolverão o episódio reacional no futuro.

Tabela 4.1-2 Desfecho dos casos de pacientes MB

Pacientes MB	Nº de casos	Níveis de IL-33, pg/mL média \pm erro padrão
Desenvolveram ENH	8	3409 ± 1049
Não desenvolveram ENH até a conclusão desse trabalho	14	$2245 \pm 658,8$

4.2 Expressão de ST-2 em biópsias de pele de pacientes com hanseníase

A função biológica da IL-33 depende da expressão do receptor ST-2 na membrana das células alvo (Kotsiou *et al.* 2018). Nesse sentido, nós avaliamos por *Western Blotting* a expressão dessa proteína em biópsias de pele de pacientes PB e MB. Nossos dados mostraram que houve a expressão de ST-2 tanto em biópsias de pacientes PB (média de $1,460 \pm 0,0332$), quanto em pacientes MB (média de $1,726 \pm 0,1426$) (Figura 4.2.1 – A e B).

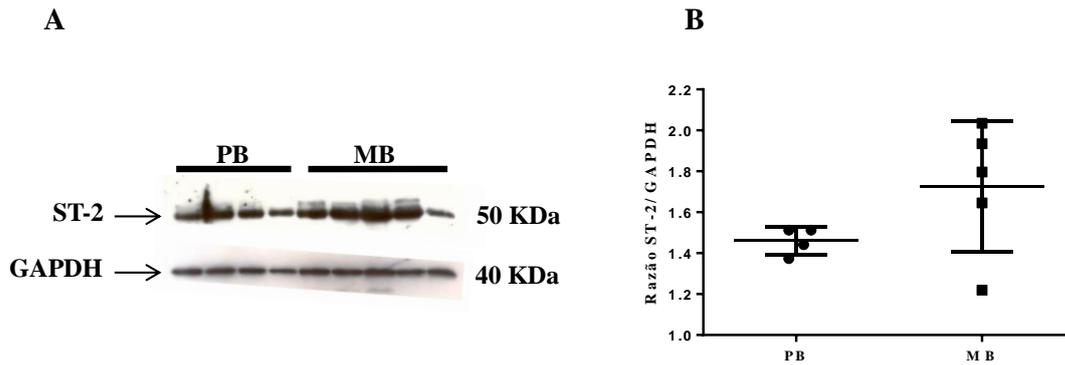


Figura 4.2.1 Expressão de ST-2 em biópsias de pele de pacientes com hanseníase. Os níveis proteicos de ST-2 foram obtidos de fragmentos de lesões de pele de pacientes PB (n = 4) e MB (n = 5) e analisados por *Western blotting* usando anticorpo específico para ST-2 e como controle usamos o GAPDH. B) Gráfico da razão ST-2/ GAPDH. Barra representa média ± erro padrão.

4.3 Detecção de níveis séricos de sST-2 em pacientes com hanseníase

Em seguida, fomos avaliar os níveis séricos de sST-2, uma vez que este pode deixar a IL-33 indisponível (Hayakawa *et al.* 2007), podendo explicar os níveis baixos dessa citocina que os pacientes PB apresentaram. Para verificar essa hipótese, nós dosamos sST-2 em amostras de soro de pacientes com hanseníase. Não houve diferença significativa nos níveis de sST-2 entre os pacientes não reacionais PB e MB ($1952 \pm 168,4$ e $2517 \pm 205,9$, respectivamente), assim como nos pacientes ENH e RR ($2529 \pm 189,7$ e $2650 \pm 232,9$, respectivamente) (figura 4.3.1 - A). Em seguida, calculamos a razão IL-33:sST-2 e observamos que pacientes MB e durante o ENH apresentaram mais IL-33 livre quando comparados a pacientes PB (figura 4.3.1- B). Em conjunto, esses resultados sugerem que a IL-33 livre poderia atuar em diversos tipos de células do sistema imune, assim como em neutrófilos circulantes de pacientes com hanseníase MB e ENH alterando o perfil fenotípico dessas células.

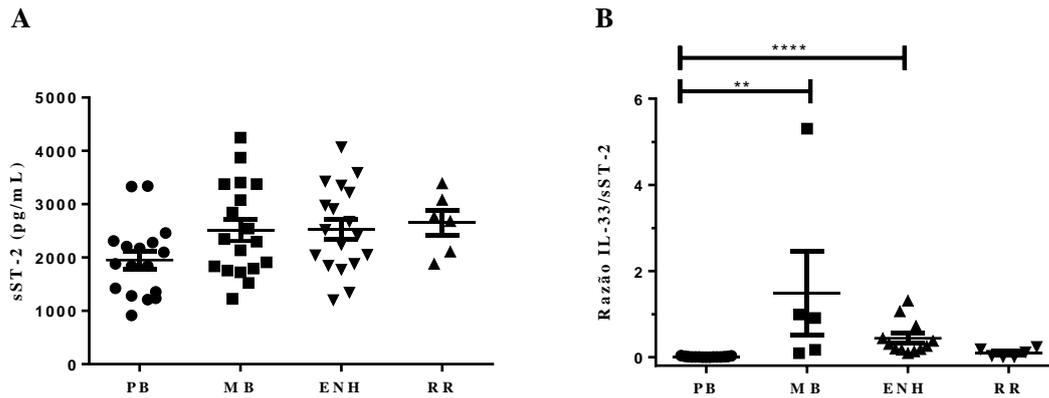


Figura 4.3.1 Pacientes MB e ENH exibem níveis de IL-33 livres maiores se comparados a pacientes PB. A) A concentração de sST-2 foi determinada por ensaio imunoenzimático ELISA, em soro de pacientes PB (n = 17), MB (n = 18), ENH (n = 18) e RR (n = 6). B) Razão IL-33/sST-2 pacientes PB (n = 15), MB (n = 5), ENH (n = 11) e RR (n = 6). Cada ponto representa um paciente. Barra representa média \pm erro padrão. Teste Kruskal-Wallis com teste de múltipla comparação de Dunn **** p < 0,0001; ** p < 0,01.

4.4 Avaliação fenotípica de neutrófilos circulantes de pacientes com hanseníase

Inicialmente, avaliamos o grau de pureza das nossas preparações de neutrófilos circulantes purificados a partir da técnica já descrita. Para isso, purificamos neutrófilos de 3 doadores saudáveis e o grau de pureza foi avaliado por duas metodologias distintas: (1) avaliação da expressão de CD16, molécula constitutivamente expressa em neutrófilos e não por outros granulócitos (Elghetany, 2002) e (2) análise morfológica de lâminas de células coradas com Panótico. A nossa análise revelou um grau de pureza de 99,1% (Figura 4.5.1 -A), que também foi confirmado por análise microscópica que revelou a presença majoritária de células com morfologia compatível com neutrófilos, ou seja, células com núcleos segmentados ou hipersegmentados (Figura 4.4.1 - B).

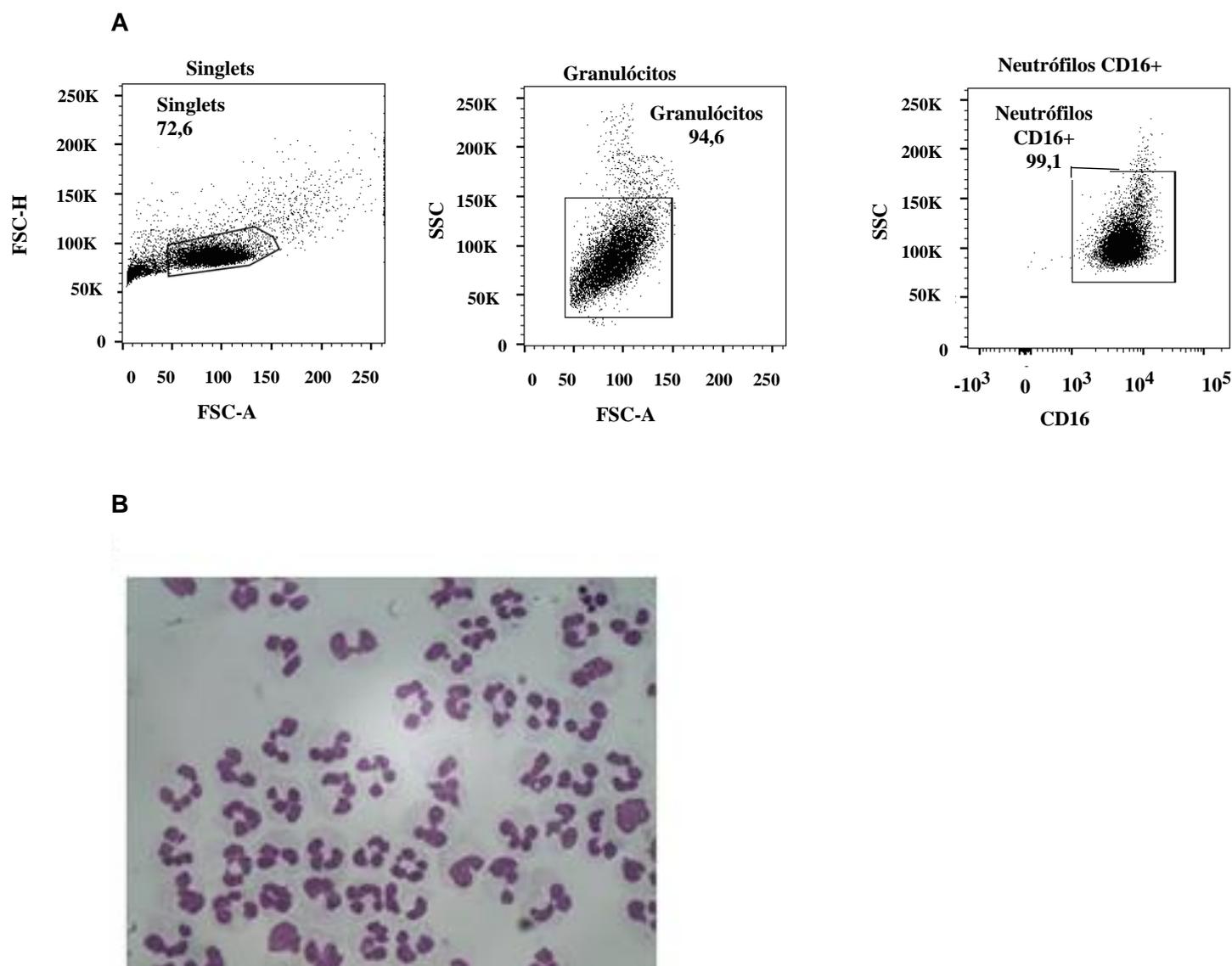


Figura 4.4.1 Grau de pureza em preparações de neutrófilos purificados a partir do sangue periférico. A) Neutrófilos foram isolados após centrifugação e separação por gradiente de Ficoll e marcados para o anticorpo anti-CD16, as análises foram realizadas por citometria de fluxo e gráficos dot-plots foram montados. Estratégia para análise: Singlets – FSC-H x FSC-A, Granulócitos – SSC-A x FSC-A, Neutrófilos – SSC-A x CD16. A porcentagem de células CD16+ foi dada pelo gate SSC vs. CD16 (n = 3). B) Imagem representativa de lâmina de citocentrifugação de neutrófilos purificados (n = 3) corados por Panótico. Aumento de 100x.

Como estratégia de análise da expressão de marcadores fenotípicos realizamos citometria de fluxo multiparamétrica. Na figura 4.4.2 demonstramos qual foi a estratégia geral de *gate* utilizada nos resultados subsequentes. O primeiro critério utilizado foi a exclusão de agregados celulares, utilizando os seguintes parâmetros FSC-H x FSC-A, altura e área, respectivamente. Após a obtenção dos *singlets*, utilizamos os parâmetros

FSC-A x SSC-A, tamanho e granulosidade, respectivamente; e dessa forma, criamos o *gate* de granulócitos. Para identificar o ponto de corte entre as fluorescências negativas, nós utilizamos como controle o FMO (*Fluorescence Minus One Control*). Esse controle vem sendo largamente utilizado na comunidade científica para marcações multiparamétricas em citometria de fluxo, possibilitando a identificação da positividade dos anticorpos em painéis multicolor. A partir disso, analisamos a expressão dos marcadores CD11b, CD49d, CD62L e CXCR2, dentro do *gate* morfológico de neutrófilos (células CD16⁺) (Figura 4.4.2). A seguir será descrito os resultados dos marcadores separadamente.

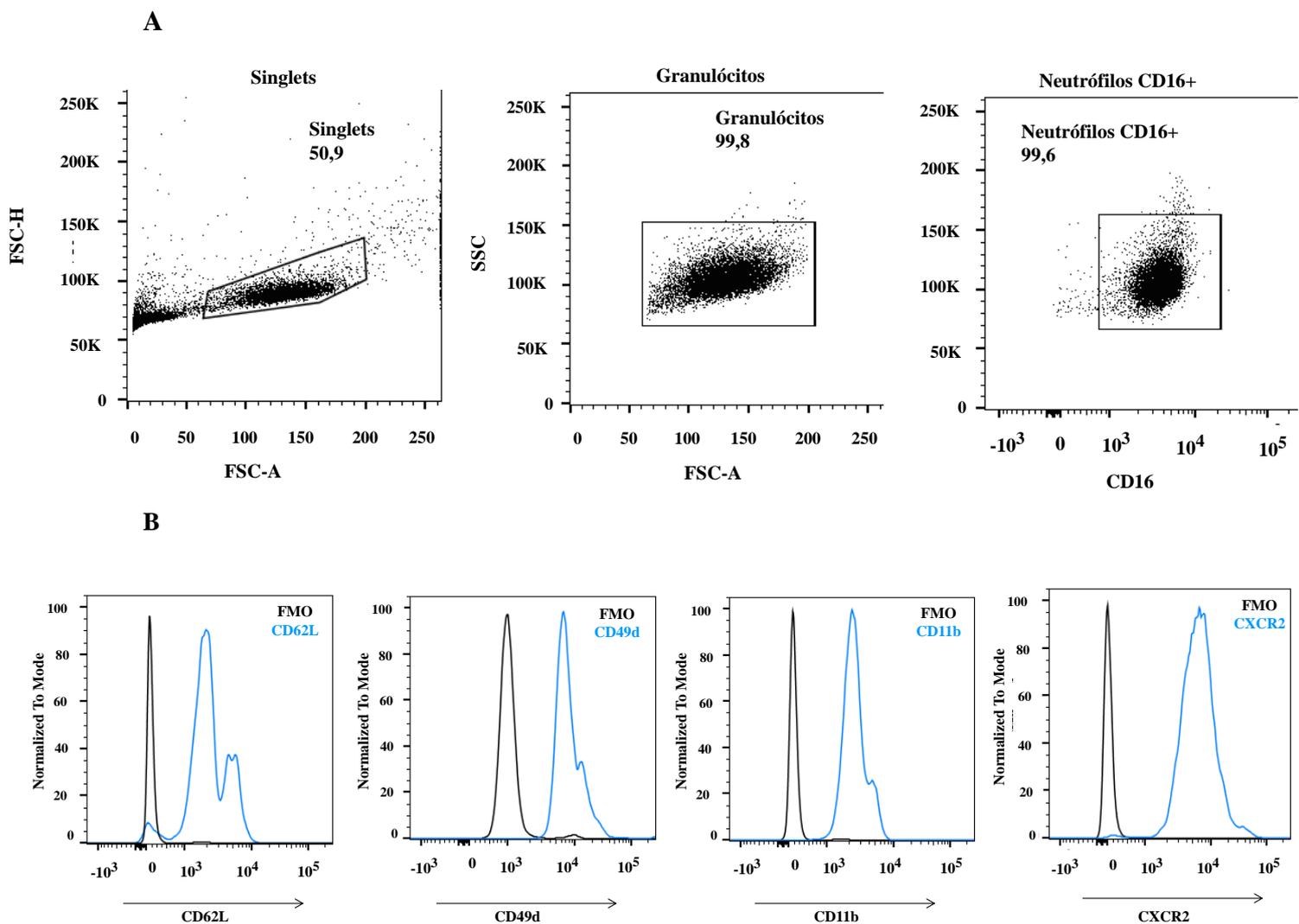


Figura 4.4-2 Estratégia para análise da expressão de CD62L, CD49d, CD11b e CXCR2 em neutrófilos de pacientes com hanseníase por citometria de fluxo multiparamétrica. A) a partir dos parâmetros FSC-H x FSC-A foi realizado a seleção dos *singlets*. Em seguida, o *gate* foi dado utilizando os parâmetros SSC-A x FSC-A seguida de novo *gate* morfológico na população de

neutrófilos CD16+. B) Histogramas representativos mostrando a positividade dos anticorpos usados comparando-os com o controle FMO.

O aumento da expressão de CD11b tem sido relacionado ao status de ativação celular de diversos tipos celulares (Elghetany, 2002). Nesse sentido fomos avaliar se a expressão desse marcador seria diferente em neutrófilos de pacientes com hanseníase. A nossa análise revelou que a expressão de CD11b foi cerca de 2 vezes maior em pacientes PB do que em pacientes MB (4117 ± 2256 e $2184 \pm 446,3$, respectivamente) (Figura 4.4.3 - A), sugerindo que neutrófilos PB estariam mais ativados que neutrófilos MB.

O CD62L (L-selectina, LECAM, LAM-1, Leu-8 ou antígeno MEL-14) é uma selectina que assim como outras está envolvida no rolamento de leucócitos na superfície endotelial e medeia a interação neutrófilo-endotélio através do reconhecimento de CD162. A média de intensidade de fluorescência (MIF) de CD62L nos neutrófilos de pacientes MB foi 11 vezes maior quando comparados a pacientes PB, ($1309 \pm 318,3$ e $115,8 \pm 73,09$, respectivamente. $p < 0,0159$) (Figura 4.4.3 - B).

Massena *et al.* 2015 descreveram uma subpopulação de neutrófilos responsivos a VEGF-A e caracterizaram essas células pela alta expressão de CD49d. Os neutrófilos CD49d+ exibiram perfil pró-angiogênico e podem ser associados ao perfil N2. Nossos resultados mostraram que a expressão de CD49d foi 8 vezes maior nos neutrófilos MB quando comparados com neutrófilos PB ($4929 \pm 736,2$ e $588,5 \pm 396,0$, respectivamente. $p < 0,0159$) (Figura 4.4.3 - C).

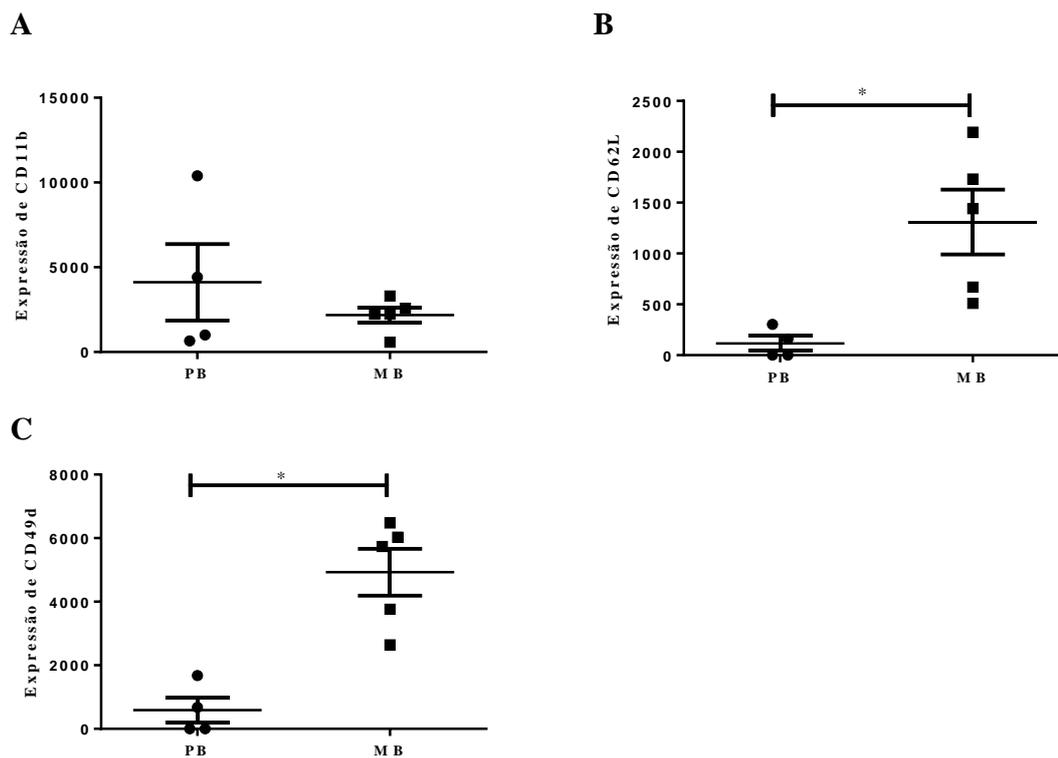


Figura 4.4.3 Neutr3filos de pacientes MB apresentam alta express3o de CD62L e CD49d quando comparados a neutr3filos PB. A m3dia de intensidade de fluoresc3ncia (MIF) foi obtida atrav3s da marca3o de neutr3filos com anticorpos anti CD11b, CD62L e CD49d e os resultados foram obtidos por citometria de fluxo multiparam3trica. A, B e C) Gr3ficos comparando a MIF de CD11b, CD62L e CD49d, respectivamente, em pacientes PB (n = 4) e MB (n = 5). Cada ponto representa um paciente. Barra representa m3dia \pm erro padr3o. Teste Mann-Whitney * P < 0,0159.

Em conjunto, os nossos dados indicam um perfil fenot3pico de ativa3o diferente entre os neutr3filos de pacientes PB versus MB, sugerindo que neutr3filos PB tenham um perfil mais ativado devido a maior express3o de CD11b, al3m disso, a express3o elevada de CD62L e CD49d sugerem que neutr3filos MB podem ser rapidamente mobilizados para as les3es de pele corroborando a abertura s3bita do quadro de ENH que 3 caracterizada pela presen3a marcante de neutr3filos na les3o. Para avaliar a nossa hip3tese, fomos avaliar a express3o dos mesmos marcadores em neutr3filos de pacientes ENH.

A an3lise da MIF de CD11b revelou que a express3o dessa mol3cula foi 5x maior em neutr3filos de pacientes MB quando comparados com pacientes ENH ($2184 \pm 446,3$ e $429,2 \pm 66,12$, respectivamente) (Figura 4.4.4 – A). A express3o de CD62L foi 4x maior nos pacientes MB quando comparados com pacientes ENH ($1309 \pm 318,3$ e $318,5 \pm 6,888$

respectivamente) (Figura 4.5.4 – B). Por último, analisamos a expressão de CD49d e observamos que foi cerca de 2 vezes maior nos neutrófilos de pacientes MB quando comparados a neutrófilos de pacientes ENH ($4929 \pm 736,2$ e $2744 \pm 481,2$, respectivamente) (Figura 4.4.4 – C). Em conjunto, esses resultados sugerem que estas moléculas podem estar envolvidas no recrutamento de neutrófilos do sangue para o tecido durante o aparecimento súbito do ENH.

Em seguida fomos avaliar se a Talidomida teria um efeito modulador na expressão desses marcadores na superfície de neutrófilos, e os nossos dados demonstram que não houve alterações na expressão de CD11b ($429,2 \pm 66,12$ e $463,4 \pm 210,0$ antes e após o tratamento, respectivamente), CD62L ($318,5 \pm 6,888$ e $339,6 \pm 104,9$, antes e após o tratamento, respectivamente) e CD49d ($2744 \pm 481,2$ e $2383 \pm 619,9$, antes e após o tratamento, respectivamente) em neutrófilos de pacientes ENH após o tratamento com a Talidomida (Figura 4.4.4 – A, B e C).

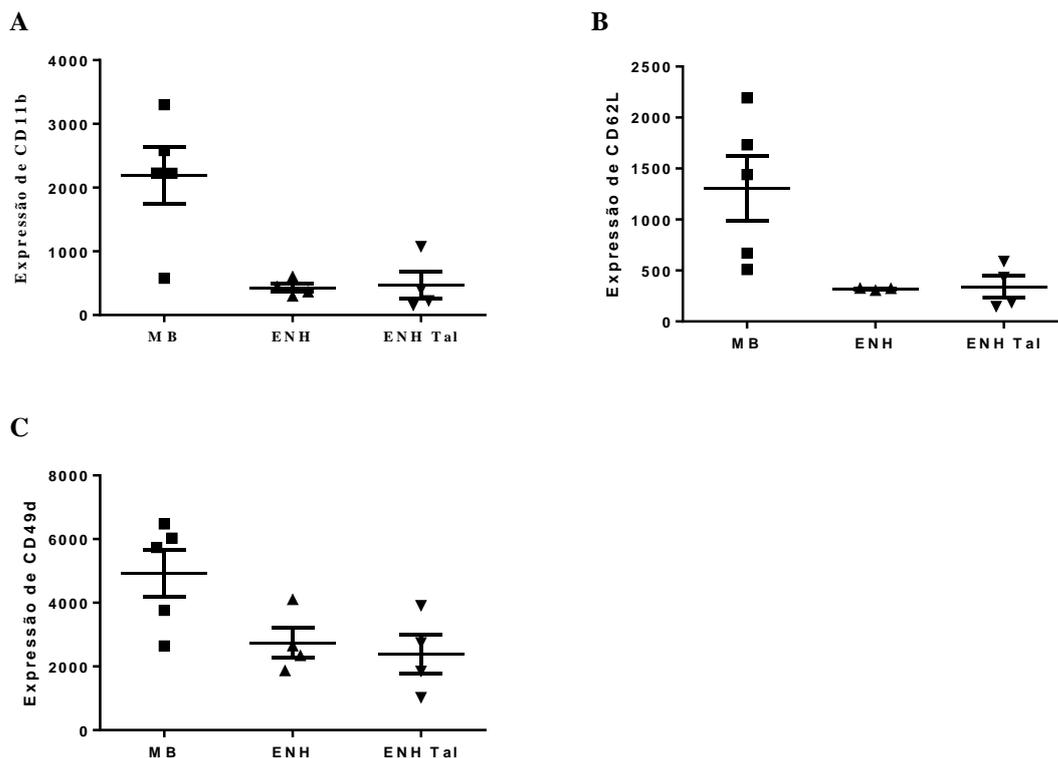


Figura 4.4.4 Neutrófilos de pacientes MB apresentam expressão aumentada de CD11b, CD62L e CD49d quando comparados a neutrófilos ENH. A, B e C) Gráficos comparando a MIF de CD11b, CD62L e CD49d, respectivamente, em pacientes MB (n = 5), ENH (n = 4) e ENH após 7 dias de tratamento com talidomida (n = 4). Cada ponto representa um paciente. Barra representa média \pm erro padrão.

Sabendo que neutrófilos podem apresentar subpopulações fenotipicamente distintas, nós fizemos uma análise detalhada para tentar identificar possíveis subpopulações de neutrófilos com essas características. Nossas análises revelaram uma subpopulação de neutrófilos positivos para CD49d e CD62L em doadores saudáveis, pacientes PB e MB e durante o episódio reacional ENH como mostrado na figura 4.4.5 – A e B.

Após a confirmação da presença dessa subpopulação no sangue de doadores saudáveis e pacientes com hanseníase nós avaliamos a frequência de distribuição dessa subpopulação. Os resultados serão apresentados em média \pm erro padrão dos grupos analisados. Doadores saudáveis apresentaram em média a frequência de $2,210 \pm 0,9396$ de células duplamente positivas para CD62L e CD49d, pacientes PB apresentaram $4,393 \pm 1,373$, entretanto, pacientes MB apresentaram aumento da frequência dessa subpopulação quando comparados a pacientes PB, em média o grupo de pacientes MB obteve $50,63 \pm 19,55$, 11 vezes maior quando comparado com pacientes PB (Figura 4.4.5 - C).

Durante o ENH, os pacientes também exibiram essa subpopulação, mas ela foi 7 vezes menor quando comparados a pacientes MB não reacionais ($50,63 \pm 19,55$ para MB e $7,070 \pm 5,230$ para ENH). Após 7 dias de tratamento com a Talidomida, houve diminuição da frequência dessa subpopulação no sangue desses pacientes ($7,070 \pm 5,230$ para ENH e $2,068 \pm 1,228$ após o início do tratamento) (Figura 4.4.5 - C).

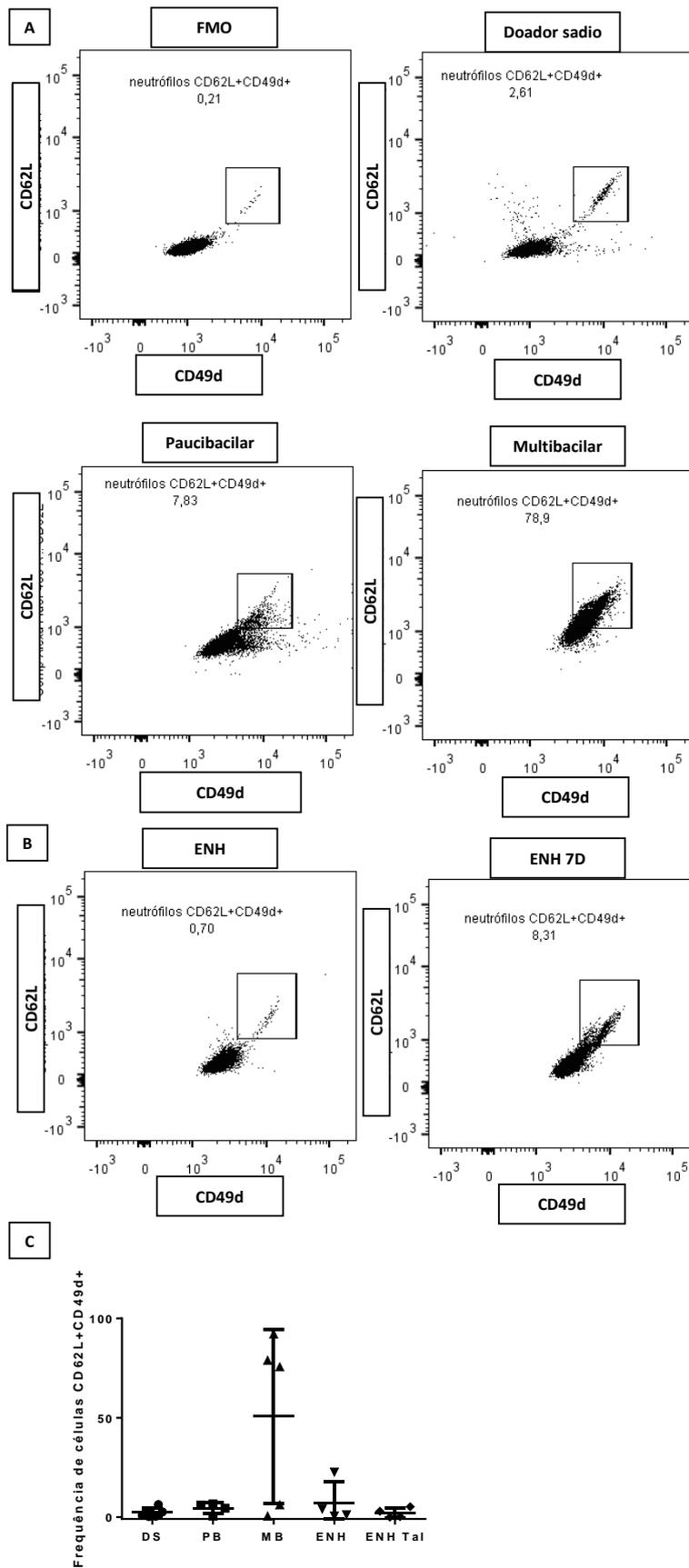


Figura 4.4.5 Pacientes com hanseníase apresentam subpopulação de neutrófilos CD62L+CD49d+. A) Estratégia de análise de subpopulação de neutrófilos em pacientes com hanseníase.

Da esquerda para direita: Controle FMO, doador sadio, paciente PB e MB. B) Dot plot representativo da análise de subpopulação CD62L+CD49d+ em pacientes ENH no dia do diagnóstico e após 7 dias do início de tratamento com a Talidomida.

Já foi descrito que neutrófilos induzidos por IL-33 apresentam aumento na expressão de CXCR2 (Liang *et al.* 2018). O CXCR2 é um receptor de IL-8 necessário para o recrutamento de neutrófilos para sítios de inflamação/lesão (Alves-Filho *et al.* 2010) e é expresso constitutivamente em neutrófilos circulantes, tendo a sua expressão aumentada ou diminuída em condições inflamatórias (Elghetany, 2002). Nossos resultados mostraram que não houve diferença na expressão desse receptor entre neutrófilos de pacientes PB e MB (5733 ± 2322 e 6970 ± 2558 , respectivamente) (Figura 4.4.5 - A), corroborando que nesses pacientes neutrófilos permanecem no sangue e não migram para as lesões de pele. Entretanto, quando comparamos MB versus ENH, foi visto um aumento de 6 vezes na expressão desse marcador (6970 ± 2558 e $1008 \pm 271,3$). Esse resultado sugere que neutrófilos que expressam altos níveis de CXCR2 migraram para lesão de pele ENH, por isso os circulantes apresentam níveis mais baixos. O tratamento com a talidomida por 7 dias não interferiu na expressão dessa molécula ($1008 \pm 271,3$ e $1138 \pm 569,4$, antes e após o tratamento, respectivamente) (Figura 4.4.5 – B).

Para o recrutamento adequado de neutrófilos, faz-se necessário que haja fatores quimiotáticos no local de inflamação (Sallusto *et al.* 2008), por esse motivo, fomos analisar a expressão gênica em lesões de pele de pacientes ENH de *CXCL8*, que é o gene da IL-8 e ligante de CXCR2. O nosso dado revelou que não houve diferença significativa na expressão de *CXCL8* antes ou 7 dias após a Talidomida, revelando que em 4 pacientes houve aumento na expressão de *CXCL8* após talidomida e 4 houve redução (Figura 4.4.5-C).

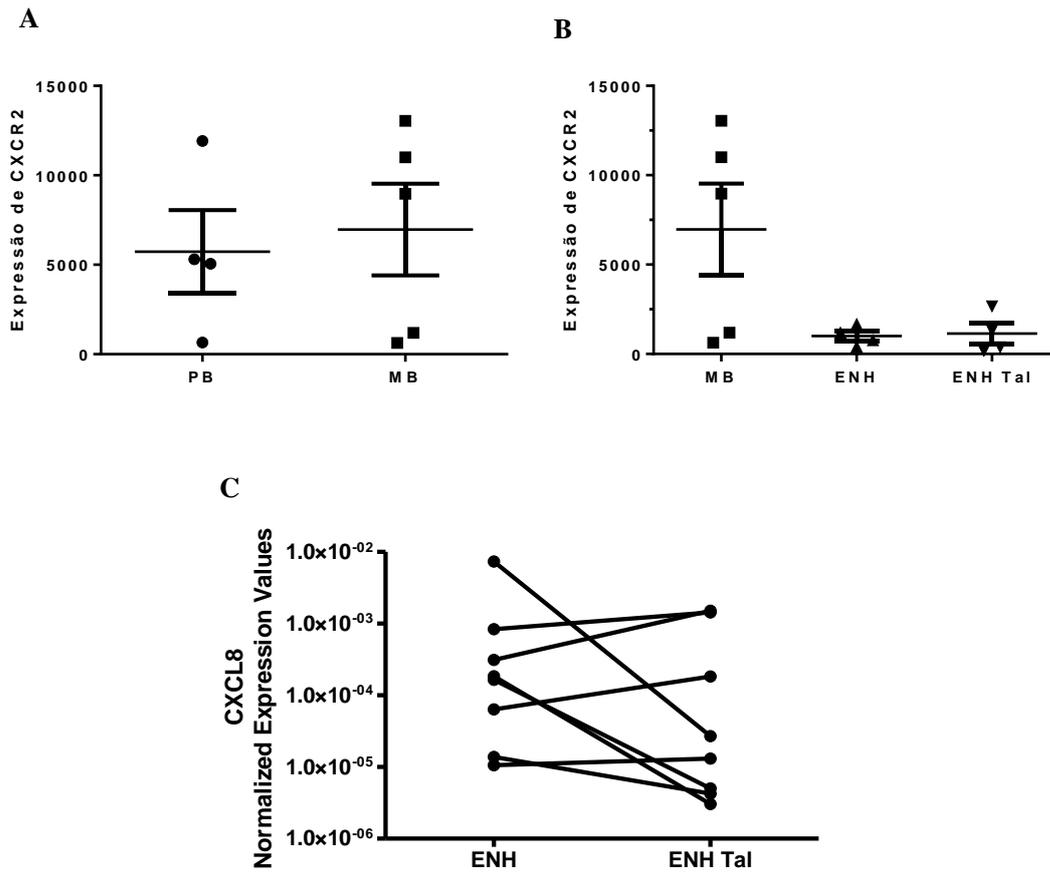


Figura 4.4.6 Neutrófilos de pacientes MB apresentam aumento na expressão de CXCR2 quando comparados a neutrófilos de pacientes ENH. A) Média de intensidade de fluorescência (MIF) para o anticorpo anti-CXCR2, foram analisados neutrófilos de pacientes PB (n = 4) e MB (n = 5). B) MIF para a expressão de CXCR2 em neutrófilos de pacientes MB (n = 5), ENH (n = 5) e pacientes ENH após o tratamento com talidomida (n = 5). C) Análise de expressão gênica de *CXCL8* em lesão de pacientes ENH tratados ou não com talidomida. Cada ponto representa um paciente. Barra representa média ± erro padrão.

5 Discussão

A família de citocinas IL-1 e seus receptores são extremamente importantes para o desenvolvimento da imunidade inata. A família é constituída por 11 membros, dentre eles, a IL-33. Embora essa família de citocinas seja extremamente importante para montar uma resposta imune inata eficaz, alguns membros da família também estão relacionados à inflamação prejudicial em algumas patologias. Em artrite reumatóide, a atividade biológica da IL-33 tem sido avaliada em modelos experimentais, bem como em soro e líquido sinovial de pacientes. Já foi demonstrado que a administração de IL-33 exacerba a artrite induzida por colágeno em modelos experimentais, e uma correlação positiva entre as concentrações de citocinas no soro e no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e atividade da doença também foi encontrada (Macedo *et al.* 2016). Até o momento, não existem trabalhos na literatura sobre a relação da IL-33 com o espectro de formas clínicas presentes na hanseníase. Nesse trabalho, demonstramos que pacientes MB exibem níveis séricos de IL-33 aumentados quando comparados com pacientes PB, esse aumento foi variável dentro do grupo de MB, e estava diretamente correlacionado ao índice baciloscópico. Além disso, nossa análise da curva de ROC revelou que os níveis séricos de IL-33 podem ser um potencial biomarcador capaz de distinguir pacientes PB de MB, já que nesse teste obtivemos 100% de sensibilidade e 100% de especificidade com Cut-off de 79.64 pg/mL. Estudos multicêntricos poderiam validar esse achado, além disso, é importante avaliar se os níveis séricos de IL-33 são afetados pela PQT.

Um dos grandes paradigmas da hanseníase é o desenvolvimento da resposta imunológica do hospedeiro durante o curso da infecção com o *M. leprae*. Muitos trabalhos têm descrito a polarização da resposta imunológica durante o curso da infecção e o aumento da susceptibilidade em desenvolver a doença, porém, os mecanismos que induzem a polarização da resposta ainda não foram bem definidos (Sousa *et al.* 2017, Dua *et al.* 2019). Esse trabalho abre novas perspectivas sobre o desenvolvimento da imunopatogênese da hanseníase já que a IL-33 pode estar envolvida.

No tecido, o dano a células epiteliais, endoteliais e fibroblastos leva a liberação de IL-33, porém, ainda não se sabe se outros tipos celulares são capazes de produzir e secretar essa citocina (Chan *et al.* 2019). Nesse trabalho, demonstramos a presença de IL-33 na sua forma pró-formada e em sua forma madura, tanto em lesões PB quanto em lesões MB, mas possivelmente não houve a liberação dessa proteína para o meio extracelular nas lesões PB, tendo em vista que os níveis séricos dessa citocina estavam baixos nesses pacientes e aumentados em pacientes MB. Análises de imunohistoquímica

poderiam corroborar esse resultado e de imunofluorescência indicar qual tipo celular poderia estar envolvido. Nile *et al.* 2010, mostraram que monócitos humanos da linhagem THP-1 produziram a pró-IL-33 após estímulo com LPS, porém a IL-33 madura foi vista somente no citoplasma dessas células e não houve a secreção dessa citocina. Entretanto, após a indução de necrose por um processo de congelamento/descongelamento, houve secreção dessa citocina para o meio extracelular indicando que somente por esse processo ocorre a liberação dessa citocina. É importante ainda que seja avaliada a capacidade do *M. leprae* em induzir necrose celular ou mecanismo semelhante para que induza a liberação de IL-33 por células residentes no tecido. De que maneira a IL-33 é produzida e liberada no soro dos pacientes com hanseníase ainda precisa ser investigado, entretanto nós hipotetizamos que os níveis séricos dessa citocina podem resultar do dano sofrido pelas células residentes da pele no momento da infecção pelo *M. leprae* e a inflamação crônica pode levar a dano tecidual que mantém a produção contínua de IL-33 e diminuição dos níveis de IFN- γ .

Kopach *et al.* 2014 mostraram que o IFN γ é capaz de atenuar a IL-33. Nesse trabalho, o grupo produziu um adenovírus para expressar duplamente IL-33 e IFN γ ou IL-33 e IL-4, esse adenovírus foi aplicado em culturas de fibroblastos e a partir disso, analisaram a produção dessas citocinas por essas células. A coexpressão de IL-33 e IFN γ , resultou na supressão dos níveis de ambas as proteínas, enquanto que a coexpressão de IL-33 e IL-4 resultou em elevação mútua. *In vivo*, a coexpressão de IL-33 e IFN γ , levou a atenuação dos níveis de IL-33. A inibição das caspases 1, 3 e 8 não apresentou efeitos sobre a produção de IL-33, mas o estímulo com IFN γ elevou os níveis da subunidade do proteassoma LMP-2, que é conhecida por possuir papel no processamento de antígenos mediados por IFN γ . O silenciamento de LMP-2 anulou o efeito do IFN γ sobre a IL-33, demonstrando que o IFN γ controla os níveis de IL-33 por intermédio de LMP-2. Os pacientes do polo PB da hanseníase apresentam níveis elevados de IFN γ , assim como os pacientes com RR (Belgaumkar *et al.* 2007) e isso poderia explicar os baixos níveis de IL-33 que esses pacientes apresentaram.

Durante muitos anos, estudou-se o receptor ST-2 no paradigma da resposta Th1xTh2, mas somente em 2005 foi descoberto o seu ligante, a IL-33 (Schmitz *et al.* 2005), desde então diversos trabalhos vem estudando a função que a esta citocina exerce sobre as células que expressam esse receptor (Dinarello, 2018). A modulação do eixo IL-33/ ST2, representa uma estratégia promissora para o tratamento de doenças que

envolvem a desregulação da sinalização de citocinas. O tratamento terapêutico utilizando anticorpo anti-ST-2 em camundongos com asma induzida reduziu drasticamente a inflamação alérgica (Ramaprakash *et al.* 2011). A exposição cutânea a alérgenos alimentares, predispõe ao desenvolvimento de alergias alimentares, geralmente sendo associada a dermatite atópica. Os níveis de IL-33 estão aumentados em dermatite atópica e o bloqueio de ST-2 reduz a gravidade da anafilaxia oral sem afetar a resposta de linfócitos Th2 ao alérgeno (Galand *et al.* 2016). O bloqueio de ST-2 pode representar uma nova alternativa de tratamento para pacientes MB, já que o bloqueio desse receptor diminui a atividade biológica da IL-33.

A capacidade de um microorganismo intracelular em estabelecer a infecção depende da sua capacidade em modular a resposta imunológica do hospedeiro e sobreviver dentro de células fagocíticas. Macrófagos estimulados com IFN γ tem sua capacidade citotóxica aumentada para micobactérias mostrando aumento da apoptose em células infectadas (Herbst *et al.* 2011). Por outro lado, a infecção de macrófagos por *M. leprae* leva ao aumento do processo de autofagia e esse mecanismo pode estar relacionado a sobrevivência do bacilo nessas células (Silva *et al.* 2017). Já foi visto que o *M. leprae* consegue sobreviver dentro de macrófagos (Moura *et al.* 2012) e isso pode estar relacionado a polarização de macrófagos na hanseníase.

Macrófagos M1 e M2 apresentam perfis distintos tanto morfológica quanto fenotipicamente, além disso, apresentam perfil diferenciado de secreção de citocinas. De Souza *et al.* 2016, mostraram que macrófagos presentes em lesões LL apresentam perfil M2 com alta expressão de CD163, CD68, Arginase-1 e alta produção de IL-10, IL-13 e TGF β . A polarização de macrófagos, surge como uma alternativa para o melhor entendimento do desenvolvimento da resposta imune inata nos polos da hanseníase. Essa polarização pode ser desencadeada diretamente pelo *M. leprae*, mas não podemos descartar a influência exercida pela IL-33 que de fato é um potente indutor de polarização de respostas imune do tipo 2 (Cayrol *et al.* 2014). Sendo assim, nossos dados podem indicar que a presença de IL-33 sérica e nas lesões de pacientes MB está envolvida na polarização de respostas imunológicas de células com perfil M2 visto que o aumento dessa citocina se correlaciona com o espectro clínico da hanseníase.

Assim como os macrófagos, os neutrófilos são células do sistema imune inato indispensáveis para a defesa do hospedeiro. Tradicionalmente os neutrófilos são associados a doenças de fase aguda, por serem as primeiras células a chegarem ao sítio de lesão/inflamação. Além disso, por muitas décadas acreditava-se que essas células

possuíam meia vida curta, em média de 6h. Nos últimos anos diversos paradigmas vêm sendo quebrados, Pillay *et al.* 2010, demonstraram que neutrófilos durante a homeostase, podem ter uma meia vida de aproximadamente cinco dias. A vida útil aumentada de neutrófilos pode estabelecer uma base para que essas células se submetam a mudanças fenotípicas e funcionais, podendo justificar a plasticidade de neutrófilos (Pillay *et al.* 2010A). De fato, muitos trabalhos têm demonstrado que os neutrófilos possuem alta plasticidade e heterogeneidade fenotípica. Atualmente, são constantemente descritos como células-chave na regulação imunológica durante as respostas imunes inata e adaptativa em diversas patologias (Costa *et al.* 2019).

A IL-33 pode atuar nos neutrófilos de duas maneiras distintas: 1) indução para um perfil imunossupressor e 2) através do recrutamento dessas células. Em modelo murino experimental de hepatite viral foi visto aumento do recrutamento de neutrófilos para o fígado, acompanhado de aumento de linfócitos T CD8+. Nesse modelo, os neutrófilos apresentaram alta expressão de arginase-1, INOS e produção de IL-10, demonstrando propriedades imunossupressoras. A depleção desses neutrófilos levou a exacerbação da lesão hepática e aumento da resposta de células T efectoras. Entretanto, o tratamento de camundongos com IL-33 aumentou o recrutamento de neutrófilos para o fígado, diminuindo a lesão hepática e limitando o acúmulo de células T efectoras. Além disso, o grupo demonstrou que a IL-33 induziu a expressão de arginase-1 em neutrófilos, induzindo-os para um perfil mais imunorregulador mediado pela produção de IL-13 por ILCs (Liang *et al.* 2018).

Outros trabalhos têm estudado a influência exercida pela IL-33 na polarização de neutrófilos. Sun *et al.* 2018 demonstraram que neutrófilos estimulados por IL-33 apresentam perfil de ativação distintos quando comparados com neutrófilos estimulados com LPS. Os neutrófilos induzidos por IL-33 produziram seletivamente IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13 e exibiram um perfil de expressão gênica distintos de neutrófilos em repouso ou estimulados com LPS. A produção de citocinas por neutrófilos de pacientes com hanseníase não foi determinada até o momento. No nosso trabalho, nossa estratégia para caracterizar fenotipicamente neutrófilos induzidos por IL-33 foi avaliar a expressão de CD11b, CD49d, CD62L e CXCR2.

O CD11b é um membro da família das integrinas e junto com CD18 forma o receptor heterodimérico CR3 (receptor do complemento 3). O CD11b é expresso em leucócitos e funcionalmente está envolvido no recrutamento dessas células para sítios inflamatórios. O aumento da expressão de CD11b tem sido relacionado ao *status* de

ativação celular de diversos tipos celulares (Elghetany, 2002). A expressão de CD11b foi avaliada afim de determinar o status de ativação de neutrófilos de pacientes PB e MB. A expressão de CD11b em neutrófilos de pacientes PB foi cerca de duas vezes maior quando comparados com neutrófilos MB, sugerindo um status de ativação maior na hanseníase PB e corroborando outros parâmetros de ativação já vistos nesses pacientes.

Massena *et al.* 2015 identificaram uma subpopulação de neutrófilos circulantes com alta capacidade pró-angiogênica nos sítios de hipóxia induzida. Essa subpopulação foi caracterizada fenotipicamente pela alta expressão de CD49d, VEGFR1 e CXCR4 e é induzida especificamente pelo fator de crescimento endotelial vascular (do inglês, *Vascular endothelial growth factor A / VEGF-A*). A capacidade pró-angiogênica de neutrófilos vem sendo amplamente discutidas em modelo tumoral, onde essas células apresentam perfil imunossupressor e pró-tumoral e contribuem para a progressão do tumor (Fridlender *et al.* 2009). No nosso trabalho, demonstramos que a expressão de CD49d foi maior nos neutrófilos de pacientes MB quando comparados a neutrófilos de pacientes PB. De fato, a angiogênese está presente em lesões cutâneas de pacientes ao longo do espectro clínico da hanseníase e o aumento da angiogênese foi correlacionado a carga bacilar, onde pacientes MB apresentam maiores níveis de angiogênese na lesão do que pacientes PB (Bhandarkar *et al.* 2007, Soares *et al.* 2013).

A angiogênese é mais acentuada em lesões de pacientes ENH (Soares et al. 2013), porém, ainda não se sabe se neutrófilos estão envolvidos na angiogênese presente na hanseníase. Quando comparamos a expressão de CD49d em neutrófilos de pacientes MB com e sem ENH notamos que durante a reação os neutrófilos circulantes apresentaram níveis menores de CD49d. A nossa hipótese é que os neutrófilos com perfil pró-angiogênico migraram para a lesão e não estão mais circulantes. Cabe ressaltar que CD49d está envolvido na adesão celular (Elghetany, 2002), etapa necessária para o recrutamento de neutrófilos.

Uma série de trabalhos do grupo do Dr. Leo Koenderman descreveu o surgimento de três subpopulações de neutrófilos na circulação após a injeção intravenosa (i.v.) de LPS em indivíduos saudáveis (Pillay *et al.* 2010B; Kamp *et al.* 2012, Pillay *et al.* 2012, Leliefeld *et al.* 2018). Essas subpopulações foram caracterizadas fenotipicamente pela expressão de CD16 e CD62L ($CD16^{bright}/CD62L^{dim}$, $CD16^{dim}/CD62L^{bright}$, $CD16^{bright}/CD62L^{bright}$) e apresentaram características morfológicas e funcionais distintas. Em 2012, o grupo mostrou que a subpopulação de neutrófilos $CD16^{bright}/CD62L^{dim}$ exibiu diminuição da capacidade de adesão em monocamada de células endoteliais (Pillay *et al.*

2012), além disso, essa subpopulação mostrou características imunossupressoras sendo capaz de inibir a resposta de células T *in vitro* (Kamp *et al.* 2012). Por último, o grupo mostrou que essa subpopulação exibiu capacidade reduzida em conter o crescimento bacteriano *in vitro* (Leliefeld *et al.* 2018).

Diferente do que esperávamos inicialmente, a expressão de CD62L foi maior nos neutrófilos de pacientes MB, mas isso pode estar associado a maior capacidade dos neutrófilos de pacientes MB em migrarem para o sítio de lesão na abertura do episódio ENH, já que o CD62L é uma L-selectina envolvida na etapa inicial de rolamento de neutrófilos em células endoteliais (Elghetany, 2002). Entretanto, é importante lembrar que para determinar um perfil de polarização de neutrófilos é necessário associar a caracterização fenotípica associada a ensaios funcionais que serão capazes de definir um perfil de polarização de neutrófilos na hanseníase.

O recrutamento de neutrófilos é fundamental para a defesa do hospedeiro contra infecções e é mediado por uma rede de quimiocinas redundantes pertencentes principalmente a família CXC. Entre os membros da família CXC encontra-se a IL-8, ENA-78 (do inglês, *epithelial cell-derived neutrophil activator*), e os membros da subfamília GRO (GRO- α , GRO- β , e GRO- γ). Essas quimiocinas recrutam neutrófilos através do engajamento de receptores CXCR1 e CXCR2. A IL-8 se liga com alta afinidade tanto em CXCR1 quanto em CXCR2. A diminuição da expressão desses receptores prejudica a chegada de neutrófilos no sítio de lesão/ inflamação (Cummings *et al.* 1999, Han, 2014,). No nosso estudo não encontramos diferenças na expressão gênica de *CXCL8*, entretanto é necessário avaliar não somente outros ligantes de CXCR1/CXCR2, assim como analisar a expressão na pele de pacientes MB não reacionais.

Estudos demonstraram que durante a sepse a expressão do CXCR2 é regulada negativamente em neutrófilos murino circulantes, diminuindo assim o recrutamento dessas células para os sítios de infecção. Esse mecanismo foi mediado pela ativação de TLR4 que levou a ativação intracelular de GRK2. O GRK2 é uma kinase que atua no controle de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). O bloqueio de TLR4 impediu a internalização do CXCR2 aumentando assim o influxo de neutrófilos para sítios infecciosos (Alves-Filho *et al.* 2009). Um ano depois, o mesmo grupo descreveu que assim como o bloqueio de TLR4, o tratamento de camundongos em sepse com a IL-33 foi capaz de bloquear os efeitos de GRK2 na internalização do CXCR2 levando ao

aumento da expressão de CXCR2 em neutrófilos circulantes e culminando no influxo dessas células para sítios infecciosos, atenuando a sepse (Alves-Filho *et al.* 2010).

Diferente do que imaginávamos, a expressão de CXCR2 não foi diferente em neutrófilos de pacientes PB e MB, indicando que os níveis elevados de IL-33 em pacientes MB não interferiram na expressão desse receptor no nosso modelo. Entretanto, quando comparamos a expressão desse receptor em neutrófilos de pacientes MB e ENH, os neutrófilos MB tiveram a expressão desse receptor 6 vezes maior do que em neutrófilos ENH. Esse resultado pode indicar que o aumento da expressão desse receptor em neutrófilos de pacientes ENH tenha aumentado rapidamente o recrutamento dessas células para os sítios de lesão e tornado essas células indisponíveis no sangue periférico. De fato, o infiltrado de neutrófilos em lesões ENH é um marco histológico dessa condição e não é observado em lesões de pacientes PB ou MB (Schmitz *et al.* 2016).

Nossos resultados corroboram com essa hipótese já que de maneira geral, houve aumento na expressão não só de CXCR2 como também de CD62L, selectina envolvida no rolamento e CD11b e CD49d, ambas integrinas envolvidas na adesão celular em neutrófilos de pacientes MB quando comparados a neutrófilos ENH indicando que células com alta expressão dessas moléculas podem ter sido rapidamente recrutadas para o tecido e se tornado indisponíveis no sangue periférico. Além disso, nós conseguimos relatar uma subpopulação de neutrófilos CD62L+CD49d+ no sangue de pacientes com hanseníase, essa subpopulação precisará ser caracterizada funcionalmente e morfológicamente para o melhor entendimento da resposta de neutrófilos na hanseníase antes e após o episódio reacional ENH.

Os resultados gerados nessa dissertação demonstram que a IL-33 pode ter um possível papel nas respostas imunes inatas (influenciando o perfil fenotípico de neutrófilos) e na imunidade adaptativa (favorecendo uma resposta imune celular do tipo 2). Além disso, não podemos descartar uma influência direta de neutrófilos na polarização dessa resposta imune celular, visto que estas células interagem com diversos tipos celulares como células dendríticas e linfócitos. Os nossos achados podem ser replicados em outros centros e em coortes maiores de forma a colocar a IL-33 como um alvo molecular para o desenvolvimento de testes diagnósticos e terapias alternativas para tratar pacientes com hanseníase.

6 Conclusões

Nesse estudo, demonstramos que a IL-33 é ativamente produzida nas lesões de pele de pacientes com hanseníase assim como seu receptor ST-2. A expressão da IL-33 e do seu receptor foi maior nas lesões de pele multibacilar quando comparada a lesão paucibacilar, sugerindo que a IL-33 pode estar envolvida na polarização da resposta imunológica do tipo 2 presente no polo MB da hanseníase. Além disso, demonstramos que os níveis séricos de IL-33 presentes no soro de pacientes MB foram drasticamente mais altos que nos pacientes PB. Essa diferença foi tão marcante que ambos os valores de sensibilidade e especificidade foram de 100% nesse teste e apontou um ponto de corte de 79.64 pg/mL de IL-33 capaz de diferenciar pacientes PB de MB.

Os níveis séricos de sST-2 não foram diferentes entre os diferentes grupos de pacientes, entretanto a razão entre IL-33 e sST-2 revelou que pacientes MB e ENH possuem IL-33 sistêmica livre, sugerindo que esta poderia atuar em células do sistema imunológico e influenciar a resposta imune durante a hanseníase.

Neutrófilos de pacientes hansenianos apresentaram perfil fenotípico distintos A expressão de CD11b foi maior em neutrófilos de pacientes PB quando comparados aos MB. Por outro lado, neutrófilos MB apresentaram maior expressão de CD49d e CD62L. A expressão de CXCR2 foi similar entre neutrófilos PB e MB. Sugerimos o seguinte fenótipo para neutrófilos PB $CD16^{positivo}CD11b^{alto}CD49d^{baixo}CD62L^{baixo}CXCR2^{positivo}$, e para MB $CD16^{positivo}CD11b^{baixo}CD49d^{alto}CD62L^{alto}CXCR2^{positivo}$.

A análise da expressão de CD11b, CD49d, CD62L e CXCR2 em neutrófilos circulantes de pacientes ENH revelou que estes apresentam níveis baixos desses marcadores. Por fim, sugerimos que neutrófilos com perfil mais ativado migraram para lesão e por isso não foram detectados na circulação devido ao reconhecido envolvimento dessas moléculas no recrutamento de neutrófilos para os sítios de injúria/inflamação.

A análise da expressão de CXCL8 em lesões de pele ENH antes e depois do tratamento com talidomida revelou não haver diferenças após tratamento, sugerindo que outros ligantes de CXCR2 possam estar envolvidos no mecanismo quimiotático de neutrófilos para lesões ENH.

7 Referências Bibliográficas

Afferni C, Buccione C, Andreone S, Galdiero MR, Varricchi G, Marone G. The Pleiotropic Immunomodulatory Functions of IL-33 and Its Implications in Tumor Immunity. *Front Immunol*. 2018 Nov 13;9:2601.

Alves-Filho JC, Freitas A, Souto FO, Spiller F, Paula-Neto H, Silva JS, *et al*. Regulation of chemokine receptor by Toll-like receptor 2 is critical to neutrophil migration and resistance to polymicrobial sepsis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Mar 10;106(10):4018-23.

Alves-Filho JC, Sônego F, Souto FO, Freitas A, Verri WA Jr, Auxiliadora-Martins M, *et al*. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. *Nat Med*. 2010 Jun;16(6):708-12.

Amako K, Iida KI, Saito M, Ogura Y, Hayashi T, Yoshida SI. Non-exponential growth of *Mycobacterium leprae* Thai-53 strain cultured in vitro. *Microbiol Immunol*. 2016 Dec;60(12):817-823.

Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, Barbosa MG de M, 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*. 2015b Mar;11(3):391–407.

Antunes SL, Motta E, de Almeida SM, Gallo ME, Nery JA, Lenzi HL. Distinct patterns of microvasculature in the cutaneous lesions of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000 Jun;68(2):143-51.

Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic Assessment of Cytokine Production of Infiltrating Cells in Various Forms of Leprosy. *Am J Pathol*. 1990 Oct;137(4):749-53.

Baekkevold ES, Roussigne M, Yamanaka T, Johansen FE, Jahnsen FL, Amalric F, *et al.* Molecular characterization of NF-HEV, a nuclear factor preferentially expressed in human high endothelial venules. *AmJ Pathol.* 2003 163:69–79

Bhandarkar SS, Cohen C, Kuruvila M, Rea TH, Mackelfresh JB, Lee DJ, *et al.* Angiogenesis in cutaneous lesions of leprosy: implications for treatment. *Arch Dermatol.* 2007 Dec;143(12):1527-9.

Barton RPE. A Clinical Study of the Nose in Lepromatous Leprosy. *Lepr. Rev.* (1974). 45,135 – 144.

Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, Deshpande S. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. *Lepr Rev,* 2007 Sep;78(3):223-30.

Bochud PY, Sinsimer D, Aderem A, Siddiqui MR, Saunderson P, Britton S, *et al.* Polymorphisms in Toll-like receptor 4 (TLR4) are associated with protection against leprosy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009 Sep;28(9):1055-65.

Brito Mde F, Ximenes RA, Gallo ME, Bühner-Sékula S. Association between leprosy reactions after treatment and bacterial load evaluated using anti PGL-I serology and bacilloscopy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008;41 Suppl 2:67-72.

Britton WJ e Lockwood DN. Leprosy. *Lancet.* 2004 Apr 10;363(9416):1209-19.

Byers DE, Alexander-Brett J, Patel AC, Agapov E, Dang-Vu G, Jin X, *et al.* Long-term IL-33-producing epithelial progenitor cells in chronic obstructive lung disease. *J Clin Invest.* 2013 Sep;123(9):3967-82.

Cayrol C, Girard JP. The IL-1-like cytokine IL-33 is inactivated after maturation by caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 2;106(22):9021-6.

Cayrol C, Girard JP. IL-33: an alarmin cytokine with crucial roles in innate immunity, inflammation and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2014 Dec;31:31-7.

Chan BCL, Lam CWK, Tam LS, Wong CK. IL33: Roles in Allergic Inflammation and Therapeutic Perspectives. *Front Immunol.* 2019 Mar 4;10:364.

Cho SN, Yanagihara DL, Hunter SW, Gelber RH, Brennan PJ. Serological Specificity of Phenolic Glycolipid I from *Mycobacterium leprae* and Use in Serodiagnosis of Leprosy. *Infect Immun.* 1983 Sep;41(3):1077-83.

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 Jun;5(2):223-5.

Constant SL, Bottomly K. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol.* 1997; 15:297-322.

Costa, S., Bevilacqua, D., Cassatella, M. A. & Scapini, P. Recent advances on the crosstalk between neutrophils and B or T lymphocytes. *Immunology* 2019 :156, 23–32.

Cummings CJ, Martin TR, Frevert CW, Quan JM, Wong VA, Mongovin SM, *et al.* Expression and function of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 in sepsis. *J Immunol.* 1999 Feb 15;162(4):2341-6.

da Silva CO, Dias AA, da Costa Nery JA, de Miranda Machado A, Ferreira H, Rodrigues TF, *et al.* Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of leprosy type 2 reactions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019 Sep 10;13(9):e0007368.

Desikan KV. Viability of *Mycobacterium leprae* outside the human body. *Lepr Rev.* 1977 Dec;48(4):231-5.

de Sousa JR, de Sousa RP, Aarão TL, Dias LB Jr, Carneiro FR, Fuzii HT, *et al.* In situ expression of M2 macrophage subpopulation in leprosy skin lesions. *Acta Trop.* 2016 May;157:108-14.

Departamento de Ciência e Tecnologia, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde - Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde - Rev Saúde Pública 2010;44(1):200-2.

Díaz Acosta CC, Dias AA, Rosa TL, Batista-Silva LR, Rosa PS, Toledo-Pinto TG *et al.* PGL I expression in live bacteria allows activation of a CD206/PPAR γ cross-talk that may contribute to successful *Mycobacterium leprae* colonization of peripheral nerves. PLoS Pathog. 2018 Jul 6;14(7):e1007151.

Dinarello CA. Overview of the IL-1 family in innate inflammation and acquired immunity. Immunol Rev. 2018 Jan;281(1):8-27.

Doyle SE, O'Connell RM, Miranda GA, Vaidya SA, Chow EK, Liu PT, *et al.* Toll-like receptors induce a phagocytic gene program through p38. J Exp Med. 2004 Jan 5;199(1):81-90.

Draper P, Kandler O, Darbre A. Peptidoglycan and arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*. J Gen Microbiol. 1987 May;133(5):1187-94.

Drutz DJ, Chen TS, Lu WH. The continuous bacteremia of lepromatous leprosy. N Engl J Med. 1972 Jul 27;287(4):159-64.

Dua B, Upadhyay R, Natrajan M, Arora M, Kithiganahalli Narayanaswamy B, Joshi B. Notch signaling induces lymphoproliferation, T helper cell activation and Th1/Th2 differentiation in leprosy. Immunol Lett. 2019 Mar;207:6-16.

Dupnik KM, Bair TB, Maia AO, Amorim FM, Costa MR, Keesen TS, *et al.* Transcriptional changes that characterize the immune reactions of leprosy. J Infect Dis. 2015 May 15;211(10):1658-76.

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

Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L *et al.* Polarization of Tumor-Associated Neutrophil Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell*. 2009 16, 183–194.

Galand C, Leyva-Castillo JM, Yoon J, Han A, Lee MS, McKenzie ANJ, *et al.* IL-33 promotes food anaphylaxis in epicutaneously sensitized mice by targeting mast cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2016 Nov;138(5):1356-1366.

Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2002. 35(4): 365-375.

Godal T, Lofgren M, Negassi k. Immune Response to *M. leprae* of Healthy Leprosy Contacts. *International Journal of Leprosy*. 1972 Volume 40, Number 3.

Han X. Constitutively active chemokine CXC receptors. *Adv Pharmacol*. 2014;70:265-301.

Haraldsen G, Balogh J, Pollheimer J, Sponheim J, Küchler AM. Interleukin-33 - cytokine of dual function or novel alarmin? . *Trends Immunol*. 2009 May;30(5):227-33.

Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Franzblau SG. *Leprosy*. *Clinical microbiology reviews*, 1988 Jul;1(3):330-48.

Hayakawa H, Hayakawa M, Kume A, Tominaga S. Soluble ST2 blocks interleukin-33 signaling in allergic airway inflammation. *J Biol Chem*. 2007 Sep 7;282(36):26369-80.

Herbst S, Schaible UE, Schneider BE. Interferon gamma activated macrophages kill mycobacteria by nitric oxide induced apoptosis. *PLoS One*. 2011 May 2;6(5):e19105.

Hertz CJ, Kiertcher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, *et al.* Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol*. 2001 Feb 15;166(4):2444-50.

Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.* 1981 Sep;147(3):728-35.

Inkeles MS, Teles RM, Pouldar D, Andrade PR, Madigan CA, Lopez D, *et al.* Cell-type deconvolution with immune pathways identifies gene networks of host defense and immunopathology in leprosy. *JCI Insight.* 2016 Sep 22;1(15): e88843.

Lastória JC, Abreu MAMM. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects – Part 1*. *An Bras Dermatol.* 2014 Mar-Apr;89(2):205-18.

Leliefeld PHC, Pillay J, Vrisekoop N, Heeres M, Tak T, Kox M, *et al.* Differential antibacterial control by neutrophil subsets. *Blood Adv.* 2018 Jun 12;2(11):1344-1355.

Liang Y, Yi P, Yuan DMK, Jie Z, Kwota Z, Soong L, *et al.* IL-33 induces immunosuppressive neutrophils via a type 2 innate lymphoid cell/IL-13/STAT6 axis and protects the liver against injury in LCMV infection-induced viral hepatitis. *Cell Mol Immunol.* 2018 Feb;16(2):126-137.

Lim KH, Staudt LM. Toll-like receptor signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Jan 1;5(1): a011247

Liu J, Wang W, Wang L, Chen S, Tian B, Huang K. IL-33 Initiates Vascular Remodelling in Hypoxic Pulmonary Hypertension by up-Regulating HIF-1 α and VEGF Expression in Vascular Endothelial Cells. *EBioMedicine.* 2018 Jul;33:196-210.

Kamp VM, Pillay J, Lammers JW, Pickkers P, Ulfman LH, Koenderman L. Human suppressive neutrophils CD16^{bright}/CD62L^{dim} exhibit decreased adhesion. *J Leukoc Biol.* 2012 Nov;92(5):1011-20.

Kibbie J, Teles RM, Wang Z, Hong P, Montoya D, Krutzik S. Jagged1 Instructs Macrophage Differentiation in Leprosy. *PLoS Pathog.* 2016 Aug 17;12(8):e1005808.

Kopach P, Lockett V, Pickering EM, Haskell RE, Anderson RD, Hasday JD, *et al.* IFN- γ directly controls IL-33 protein level through a STAT1- and LMP2-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2014 Apr 25;289(17):11829-43.

Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *2009 Annu Rev Immunol* 27;485-517.5.517.

Kotsiou OS, Gourgoulianis KI, Zarogiannis SG. IL-33/ST2 Axis in Organ Fibrosis. *Front Immunol.* 2018 Oct 24;9:2432.

Krutzik SR, Tan B, Li H, Ochoa MT, Liu PT, Sharfstein SE, *et al.* TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat Med.* 2005 Jun;11(6):653-60.

Macedo RB, Kakehasi AM, Melo de Andrade MV. IL33 in rheumatoid arthritis: potential contribution to pathogenesis. *Rev Bras Reumatol Engl Ed.* 2016 Sep - Oct;56(5):451-457

Madigan CA, Cambier CJ, Kelly-Scumpia KM, Scumpia PO, Cheng TY, Zailaa J, *et al.* A Macrophage Response to *Mycobacterium leprae* Phenolic Glycolipid Initiates Nerve Damage in Leprosy. *Cell.* 2017 Aug 24;170(5):973-985.e10.

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

Marques DP. Reestruturação do treinamento em biossegurança dos profissionais no Laboratório de hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz (Fiocruz). Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado em Saúde, Medicina Laboratorial e Tecnologia Forense – UERJ; 2017.

Martin MU. Special aspects of interleukin-33 and the IL-33 receptor complex. *Semin Immunol.* 2013 Dec 15;25(6):449-57.

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 Oct 22;126(17):2016-26

Mattos KA, D'Avila H, Rodrigues LS, Oliveira VG, Sarno EN, Atella GC, *et al*. Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol*. 2010 Mar;87(3):371-84.

Millrine D, Kishimoto T. A Brighter Side to Thalidomide: Its Potential Use in Immunological Disorders. *Trends Mol Med*. 2017 Apr;23(4):348-361.

Ministério da saúde, Brasil. <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseniose#tratamento>. Acesso em 02.06.2019

Modlin RL, Kato H, Mehra V, Nelson EE, Fan XD, Rea TH, *et al*. Genetically restricted suppressor T-cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. *Nature*. 1986 Jul 31-Aug 6;322(6078):459-61.

Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Opin Immunol*. 2010 Feb;22(1):48-54.

Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical distance, genetic relationship, age, and leprosy classification are independent risk factors for leprosy in contacts of patients with leprosy. *J Infect Dis*. 2006 Feb 1;193(3):346-53.

Montoya D, Cruz D, Teles RM, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, *et al*. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009; 6(4):343-53.

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

Morgado FFR, Silveira EMKX, Sales AM, Nascimento LPR, Sarno EN, Nery JAC, *et al.* Cross-cultural adaptation of the EMIC Stigma Scale for people with leprosy in Brazil. *Rev Saude Publica.* 2017 Sep 4;51:80.

Moro K, Yamada T, Tanabe M, Takeuchi T, Ikawa T, Kawamoto H, *et al.* Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. *Nature.* 2010 Jan 28;463(7280):540-4.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008 Dec;8(12):958-69.

Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol.* 1998 Oct;37(10):733-40.

Moura DF, de Mattos KA, Amadeu TP, Andrade PR, Sales JS, Schmitz V, *et al.* CD163 favors *Mycobacterium leprae* survival and persistence by promoting anti-inflammatory pathways in lepromatous macrophages. *Eur J Immunol.* 2012 Nov;42(11):2925-36.

Murray PJ. Macrophage Polarization. *Annu Rev Physiol.* 2017 Feb 10; 79:541-566.

Naafs B. Treatment duration of reversal reaction: a reappraisal. Back to the past. *Lepr Rev.* 2003 Dec;74(4):328-36.

Naafs B, van Hoes CL. Leprosy type 1 reaction (formerly reversal reaction). *Clin Dermatol.* 2016 Jan-Feb;34(1):37-50.

Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TK, *et al.* Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature.* 2010 Apr 29;464(7293):1367-70.

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

Nile CJ, Barksby E, Jitprasertwong P, Preshaw PM, Taylor JJ. Expression and regulation of interleukin-33 in human monocytes. *Immunology*. 2010 Jun;130(2):172-80.

Oldenburg R, Mayau V, Prandi J, Arbues A, Astarie-Dequeker C, Guilhot C, *et al*. Mycobacterial Phenolic Glycolipids Selectively Disable TRIF-Dependent TLR4 Signaling in Macrophages. *Front Immunol*. 2018 Jan 19; 9:2.

Oliveira RB, Moraes MO, Oliveira EB, Sarno EN, Nery JAC, Sampaio EP. Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF- α and exhibit accelerated apoptosis in vitro. *J. Leukoc. Biol*. 1999. 65: 364–371.

Organização Mundial da Saúde. Chemotherapy of leprosy for control programmes: report of a WHO study group. <http://www.who.int/iris/handle/10665/38984>. WHO; 1982.

Organização Mundial da Saúde. Expert Committee on Leprosy: seventh report; <http://www.who.int/iris/handle/10665/42060>. WHO; 1998.

Organização Mundial da Saúde. Global Leprosy Strategy 2016–2020: Accelerating towards a leprosy-free world. <https://www.who.int/lep/resources/9789290225096/en/> WHO; 2016.

Organização Mundial da Saúde. Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. *Weekly Epidemiological Record* 35; 93:445–456 <http://www.who.int/wer>. WHO; 2018.

Onda H, Kasuya H, Takakura K, Hori T, Imaizumi T, Takeuchi T, Inoue I, Takeda J. Identification of genes differentially expressed in canine vasospastic cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999 Nov;19(11):1279-88.

Pai VV, Tayshetye PU, Ganapati R. A study of standardized regimens of steroid treatment in reactions in leprosy at a referral centre. *Indian J Lepr* 2012;84(1):9-15.

Pillay J, den Braber I, Vrisekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, *et al.* In vivo labeling with 2H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood*. 2010A Jul 29;116(4):625-7.

Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi AL, Lam SW, Hietbrink F, *et al.* Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol*. 2010B Jul;88(1):211-20.

Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, *et al.* A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. 2012 Jan;122(1):327-36.

Pinheiro RO, Schmitz V, Silva BJA, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG *et al.* Innate Immune Responses in Leprosy. *Front Immunol*. 2018 Mar 28;9:518.

Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN. A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. *Front Immunol*. 2017 Mar 13; 8:233.

Ramaprakash H, Shibata T, Duffy KE, Ismailoglu UB, Bredernitz RM, Moreira AP, *et al.* Targeting ST2L potentiates CpG-mediated therapeutic effects in a chronic fungal asthma model. *Am J Pathol*. 2011 Jul;179(1):104-15.

Ramien ML, Wong A, Keystone JS. Severe refractory erythema nodosum leprosum successfully treated with the tumor necrosis factor inhibitor etanercept. *Clin Infect Dis*. 2011 Mar 1;52(5):e133-5.

Rao PN. Global leprosy strategy 2016–2020: Issues and concerns. *Indian J Dermatol Venereol Leprol* 2017; 83:4-6.

Rêgo JL, Santana NL, Machado PRL, Ribeiro-Alves M, de Toledo-Pinto TG, Castellucci LC, Moraes MO. Whole blood profiling of leprosy type 1(reversal) reactions highlights prominence of innate immune response genes. *BMC Infect Dis*. 2018 Aug 24;18(1):422.

Reibel F, Cambau E, Aubry A. Update on the epidemiology, diagnosis, and treatment of leprosy. *Med Mal Infect.* 2015 Sep;45(9):383-93.

Ribeiro MDA, Silva JCA, Oliveira SB. Estudo epidemiológico da hanseníase no Brasil: reflexão sobre as metas de eliminação. *Rev Panam Salud Publica*, 2018;42:e42.

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.

Rodrigues RWP, Ribeiro AB, Berber GCM, Sheng LY, Damazo AS. Analysis of clinical data and T helper 1/T helper 2 responses in patients with different clinical forms of leprosy. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017 Mar-Apr;50(2):208-215.

Saini C, Ramesh V, Nath I. CD4+ Th17 Cells Discriminate Clinical Types and Constitute a Third Subset of Non Th1, Non Th2 T Cells in Human Leprosy. *PLoS Negl Trop Dis* 2013 9(7): e2338.

Sadhu S, Mitra DK. Emerging Concepts of Adaptive Immunity in Leprosy. *Front Immunol.* 2018 Apr 9; 9:604.

Sakurai I, Skinsnes OK: Lipids in leprosy. 2. Histochemistry of lipids in human leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1970, 38:389-403.

Sallusto F, Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nat Immunol.* 2008 Sep;9(9):949-52.

Sales-Marques C, Cardoso CC, Alvarado- Arnez LE, Illaramendi X, Sales AM, Hacker Mda, *et al.* Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. 2017 *PLoS Negl Trop Dis* 11(7): e0005754.

Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, Bloom BR. Differing Lymphokine Profiles of Functional Subsets of Human CD4 and CD8 T Cell Clones. *Science*. 1991 Oct 11;254(5029):279-82.

Schmitz J, Owyang A, Oldham E, Song Y, Murphy E, McClanahan TK *et al.* IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity*. 2005 Nov;23(5):479-90.

Schmitz V, Prata RB, Barbosa MG, 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 Aug 24;10(8): e0004955.

Schmitz V, Tavares IF, Pignataro P, Machado AM, Pacheco FDS, Dos Santos JB, da Silva CO, Sarno EN. Neutrophils in Leprosy. *Front Immunol*. 2019 Mar 19;10:495.

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.

Silva BJ, Barbosa MG, Andrade PR, Ferreira H, Nery JA, Côrte-Real S, *et al.* Autophagy Is an Innate Mechanism Associated with Leprosy Polarization. *PLoS Pathog*. 2017 Jan 5;13(1):e1006103.

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 Nov 28;8:1635.

Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina*. Ribeirão Preto, 1997.

Soares CT, Rosa PS, Trombone AP, Fachin LR, Ghidella CC, Ura S, *et al.* Angiogenesis and lymphangiogenesis in the spectrum of leprosy and its reactional forms. *PLoS One*. 2013 Sep 6;8(9):e74651.

Suzuki K, Akama T, Kawashima A, Yoshihara A, Yotsu RR, Ishii N. Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives, *journal of dermatology*, 2012.

Sun B, Zhu L, Tao Y, Sun HX, Li Y, Wang P, *et al.* Characterization and allergic role of IL-33-induced neutrophil polarization. *Cell Mol Immunol*. 2018 Aug;15(8):782-793.

Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clinics in Dermatology* (2015) 33, 26–37.

Tavares IF. Identificação e caracterização fenotípica de subpopulações de neutrófilos de baixa densidade no Eritema Nodoso Hansênico. Rio de Janeiro. Dissertação de mestrado em Medicina Tropical – IOC / Fiocruz, 2019.

Trautman, JR. A brief history of hansen's disease. *Bulletin of the New York academy of medicine*. 1984; Vol. 60, No. 7.

Van-Veen NH, Lockwood DN, van Brakel WH, Ramirez J Jr, Richardus JH. Interventions for erythema nodosum leprosum. *Cochrane Database Syst Rev*. 2009 Jul 8;(3):CD006949.

Virchow R: *Die krankhaften Geschwülste*. Berlin: August Hirschwald; 1863.

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

Walker SL, Lebas E, Doni SN, Lockwood DN, Lambert SM. The mortality associated with erythema nodosum leprosum in Ethiopia: a retrospective hospital-based study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Mar 13;8(3): e2690.

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 Sep 9;9(9): e0004065.

Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, Modlin RL.
Defining Protective Responses to Pathogens: Cytokine Profiles in Leprosy Lesions.
Science, 1991 Oct 11;254(5029):277-9.