

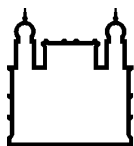
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular e Molecular

**ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DO INTERFERON TIPO I NA
IMUNOPATOGÊNESE DO ERITEMA NODOSO HANSENIANO**

THAÍS FERNANDA RODRIGUES

Rio de Janeiro
Setembro/2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia celular e molecular

THAÍS FERNANDA RODRIGUES

Análise do envolvimento do interferon tipo I na imunopatogênese do eritema nodoso hanseniano

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

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

RIO DE JANEIRO

Setembro/2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca de Manguinhos/ICICT / FIOCRUZ - RJ

Rodrigues, Thais Fernanda.

Análise do envolvimento do interferon tipo I na imunopatogênese do eritema nodoso hanseniano / Thais Fernanda Rodrigues. - Rio de Janeiro, 2019.

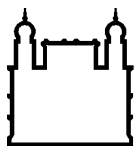
xvi, 78 f.; il.

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

Orientadora: Maria Cristina Vidal Pessolani.

Bibliografia: f. 66-77

1. Hanseníase . 2. Eritema nodoso hanseniano. 3. Interferon do tipo I. I.
Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: THAIS FERNANDA RODRIGUES

ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DO INTERFERON TIPO I NA IMUNOPATOGÊNESE DO ERITEMA NODOSO HANSEIANO

ORIENTADORA: Prof. Dra. Maria Cristina Vidal Pessolani

Aprovada em: 27/09/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Nome – Milton Ozorio Moraes (IOC/Fiocruz)

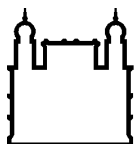
Prof. Dr. Nome – Dilvani Oliveira Santos (UFF/RJ)

Prof. Dr. Nome – Luzia Maria de Oliveira Pinto (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Nome – Luciana Silva Rodrigues (UERJ/RJ)

Prof. Dr. Nome – Roberta Olmo Pinheiro (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 27 setembro de 2019




Ministério da Saúde

FIOCRUZ


Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular de **Thais Fernanda Rodrigues**, sob orientação da Dr^a. Maria Cristina Vidal Pessolani. Ao vigésimo sétimo dia do mês de setembro de dois mil e dezenove, realizou-se às nove horas, na Sala A9 do Pavilhão Leônidas Deane, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Análise do envolvimento do interferon tipo i na imunopatogênese do eritema nodoso hanseniano**", no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Farmacologia e Imunologia, na linha de pesquisa: Mecanismos Imunológicos Envolvidos na Patologia de Doenças Autoimunes Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Milton Ozório Moraes - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Dilvani Oliveira Santos - UFF/RJ, Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Luciana Silva Rodrigues – UERJ/RJ e Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro – IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 27 de setembro de 2019.


Dr. Milton Ozório Moraes (Presidente da Banca):


Dr. Dilvani Oliveira Santos (Membro da Banca):


Dr^a. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Membro da Banca):


Dr^a. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

Dedico esta dissertação principalmente a minha mãe e ao meu pai, a toda a minha família e amigos e a todos que me ajudaram a chegar até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Por estar sempre me abençoando, guiando meus caminhos e dando força para seguir em frente;

Aos meus pais, Ricardo e Rosemere, obrigada por acreditarem em mim me dando todo incentivo e apoio nas minhas escolhas. Por todo carinho, educação, dedicação e amor incondicional em todos os momentos da minha vida. Obrigada por serem a minha base e força para sempre seguir em frente;

Agradeço a minha irmã Bruna e meu cunhado Carlos, por sempre acreditarem em mim e dar muito apoio para os meus sonhos.

À minha orientadora Dra. Maria Cristina pela oportunidade, pela ótima orientação e por todo aprendizado. Agradeço pelo exemplo e pela inspiração todos os dias. Obrigada por confiar em mim;

Agradeço a Dra Veronica Schmitz, por toda paciência, carinho, aprendizado, e pelos conselhos. Obrigada por todo o suporte durante essa etapa que é muito importante para mim;

A todos os meus familiares que tanto torcem e se orgulham de mim;

Aos meus amigos que me proporcionaram momentos de distração que foram essenciais. Todos são muito importantes na minha vida;

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Celular e Hanseníase por todos os ensinamentos valiosos, muita paciência para me ensinar e esclarecer minhas dúvidas;

Em especial agradeço ao André que esteve comigo desde o início me ensinando, esclarecendo milhões de dúvidas, e sempre com bom humor e um sorriso no rosto. A Thabatta que também me ensinou muito, me ajudou em diversos momentos sempre com muita paciência e calma. A Mayara que dedicou parte do seu tempo para me ensinar tudo que sabia sobre PCR, e sempre muito disposta a me

ajudar. A Natasha por toda a sua ajuda sempre que precisei. Obrigada por toda experiência compartilhada. Sem vocês, este trabalho não teria sido possível;

Agradeço muito às minhas amigas Fabiana, Jessica, Isabella, por toda ajuda durante o mestrado. Sempre que eu precisei que elas estivessem comigo, seja na bancada ou na vida, elas se fizeram presente. Obrigada pela amizade de vocês, pelos momentos divertidos, por todas as discussões sobre ciência, e por toda experiência compartilhada. Obrigada vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui;

A toda equipe do ambulatório Souza Araújo, e especial ao Dr. José Augusto, pelo apoio essencial no recrutamento dos pacientes, pela ajuda com os prontuários e por toda atenção e ensinamento sobre hanseníase e paciente com reação;

Aos pacientes de hanseníase. Sem vocês teria sido impossível a realização deste trabalho;

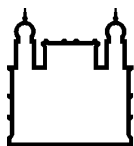
Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pelas excelentes aulas e grandioso ensinamento compartilhado;

Às agências de fomento IOC e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa dissertação;

Minha eterna gratidão aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este sonho pudesse ser concretizado. Eu jamais chegaria até aqui sozinha!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

"Você nunca sabe que resultados virão da sua ação. Mas se você não fizer nada, não existirão resultados".
(*Mahatma Gandhi*)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

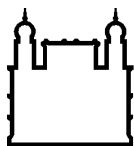
ANÁLISE DO ENVOLVIMENTO DO INTERFERON TIPO I NA IMUNOPATOGÊNESE DO ERITEMA NODOSO HANSENIANO

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Tháís Fernanda Rodrigues

A forma multibacilar da hanseníase pode apresentar manifestações inflamatórias agudas, conhecidas como episódios reacionais. Um desses episódios é o eritema nodoso hanseniano (ENH), considerado o quadro clínico mais grave da hanseníase, sendo caracterizado pelo aparecimento abrupto de múltiplas lesões novas, sintomas sistêmicos e agravamento da neuropatia. A talidomida é o fármaco de escolha para o tratamento e tem efeito benéfico num curto período de tempo. Dados recentes do nosso grupo demonstram uma maior expressão de TLR-9, tanto nas lesões como no sangue de pacientes ENH. Uma consequência importante da ativação da via de TLR-9 é a produção de IFN tipo I, especialmente o IFN- α . Essa citocina tem sido implicada na patogênese de várias doenças inflamatórias crônicas com intercorrências agudas, como a psoríase e o lúpus eritematoso sistêmico, contribuindo para uma desregulação da imunidade inata e adquirida e amplificação do processo inflamatório. Baseado nos dados acima citados, este estudo teve como objetivo analisar a participação de IFN-I na patogênese do ENH. Para alcançar este objetivo, amostras de sangue e lesões de pele de pacientes com as formas multibacilares sem reação (grupo LL/BL) e com diagnóstico da reação antes de iniciar o tratamento com talidomida (grupo ENH D0) foram coletadas. Também analisamos amostras clínicas de pacientes ENH após 7 dias de tratamento com talidomida (grupo ENH D7) para avaliar o impacto deste medicamento na via de IFN-I. Foram realizados ensaios de imunofluorescência e PCR em tempo real para investigar, respectivamente, a presença de IFN- α e a expressão de genes de assinatura de IFN-I (*EIF2AK2*, *MX1* e *IFIT-1*). Além disso, os níveis da proteína MX1 na lesão cutânea foram analisados através de *western blotting*. Os resultados de expressão gênica indicam níveis mais elevados de RNAm de *EIF2AK2* tanto na lesão cutânea como no sangue de pacientes ENH D0. Já no que se refere aos genes *MX1* e *IFIT-1* não houve diferença entre os grupos. O tratamento com a talidomida resultou na diminuição da expressão dos genes *EIF2AK2* e *MX1*. Os níveis proteicos de MX1 se mostraram elevados nos pacientes LL/BL e ENH D0, com uma diminuição após o tratamento com a talidomida. Imagens de imunofluorescência sugerem a presença de um maior número de células produtoras de IFN- α nas lesões de pacientes ENH D0 quando comparadas a LL/BL, ocorrendo uma diminuição drástica após 7 dias de tratamento com talidomida. Finalmente, confirmamos que o IFN- α possui a capacidade de induzir a NETose em neutrófilos de indivíduos saudáveis. Em conjunto esses resultados sugerem o envolvimento do IFN do tipo I na patogênese do ENH, abrindo perspectivas para a identificação de biomarcadores para o diagnóstico precoce do ENH e novos alvos para melhor conduta terapêutica deste episódio reacional.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ANALYSIS OF TYPE I INTERFERON INVOLVEMENT IN THE IMMUNOPATHOGENESIS OF ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY

Thaís Fernanda Rodrigues

The course of multibacillary leprosy may be interrupted by acute inflammatory episodes known as leprosy reactions. Erythema nodosum leprosum (ENL) is considered the most severe reactional episode, being characterized by the abrupt onset of multiple new lesions and systemic symptoms and worsening of neuropathy. Thalidomide is the drug of choice for ENL treatment with a beneficial effect in a short time period. Recent data from our group have shown an increased TLR-9 expression in both the lesions and in the circulating mononuclear cells of ENL patients. Moreover, the serum levels of endogenous DNA-histone and mycobacterial DNA-histone complexes, which are TLR-9 ligands, were also high in ENL patients. An important consequence of the activation of the TLR-9 pathway is the production of type-I interferon (IFN-I). This cytokine has been shown to play a key role in the pathogenesis of several chronic inflammatory diseases with acute interurrences such as psoriasis and systemic lupus erythematosus. Based on the above-mentioned data, this study aimed to analyze the participation of IFN-I in the pathogenesis of ENL. To achieve this goal, blood samples and skin lesions from unreactive multibacillary patients (LL / BL group) and patients diagnosed with ENL before starting thalidomide treatment (ENL D0 group) were collected. We also analyzed clinical samples from ENL patients after 7 days of thalidomide treatment (ENL D7 group) to assess the impact of thalidomide on the IFN-I pathway. Immunofluorescence and real-time PCR assays were performed to investigate, respectively, the presence of IFN- α and the expression of IFN-I signature genes (IFIT-1, MX-1 and EIF2AK2). In addition, MX1 protein levels in the skin lesion were analyzed by western blotting. Our gene expression data indicate higher levels of EIF2AK2 mRNA in both skin lesions and blood of ENL D0 patients. Regarding the expression of MX1 and IFIT1 genes, no difference between the groups was observed. Thalidomide treatment resulted in decreased expression of EIF2AK2 and MX1 genes. Protein levels of MX1 were elevated in LL/BL patients and ENL D0, with a decrease after thalidomide treatment. Immunofluorescence images suggested the presence of a greater number of IFN- α producing cells in the lesions of ENL D0 patients compared to LL/BL, and with a drastic decrease in production after 7 days of thalidomide treatment. Finally, we confirmed that IFN- α has the ability to induce NETose in neutrophils from healthy individuals. Taken together, our data suggest the involvement of type I IFN in the pathogenesis of ENL, with perspectives for the identification of biomarkers for early diagnosis and new therapeutic targets for a better management of this reactional episode.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Hanseníase	1
1.1.1 Epidemiologia, aspectos gerais	1
1.1.2 <i>Mycobacterium leprae</i>	3
1.1.3 Formas clínicas da hanseníase	5
1.1.4 Diagnóstico e tratamento	9
1.2 Eritema nodoso hanseniano	11
1.3 Interferon do tipo I	17
1.3.1 Via de sinalização do IFN do tipo I	19
1.3.2 Papel do IFN do tipo I em diferentes contextos patológicos	23
1.4 Justificativa	27
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 MATERIAL e METODOS	29
3.1 População de estudo	29
3.2 Considerações éticas	30
3.3 Extração de RNA total	31
3.4 Quantificação e análise da integridade do RNA	32
3.5 Tratamento com DNase e Síntese de cDNA	33
3.6 RT-qPCR em tempo real para análise da expressão gênica	33
3.7 Imunofluorescência	34
3.8 Extração e quantificação de proteínas de biópsias de pele	34
3.9 Western Blotting	35
3.10 Quantificação de interferon do tipo I pelo kit QUANTI-Blue	36
3.11 Purificação de PBMC e neutrófilos de sangue total por Ficoll	36
3.12 Cultura de PBMC	37
3.13 Cultura de neutrófilos	38
3.14 Quantificação de DNA	38

3.14	Análise estatística	38
4	RESULTADOS	39
4.1	Caracterização dos pacientes ENH incluídos no estudo	39
4.2	Análise da transcrição de genes induzidos por IFN do tipo I em lesão de pele de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7	41
4.3	Análise da expressão de MX1 em lesões de pele de pacientes LL/BL, ENH e ENH D7	44
4.4	Análise da presença de IFN- α em lesões de pele obtidas de biópsias de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7	46
4.5	Análise da transcrição de genes induzidos por IFN do tipo I em sangue total de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7	48
4.6	Quantificação da concentração sérica de IFN do tipo I em pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7	51
4.7	Análise da capacidade do IFN- α de potencializar a NETose induzida por <i>M. leprae</i>	52
4.8	Análise da produção de IFN-I por PBMCs de pacientes multibacilares LL/BL e ENH	53
5	DISCUSSÃO	54
6	CONCLUSÃO	64
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
8	ANEXOS	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase, 2018 (WHO, 2019)	2
Figura 2: Grafico de distribuição de novos casos de hanseníase no Brasil em 2018	3
Figura 3: Morfologia do <i>M. leprae</i> e seu cultivo em pata de camundongo	4
Figura 4: O espectro da hanseníase e possíveis mecanismos de dano tecidual	7
Figura 5: Reação reversa e eritema nodoso na hanseníase.....	9
Figura 6: Receptores Toll-like (TLRs) e seus ligantes	20
Figura 7: Representação esquemática da via de sinalização do IFN-I e indução de ISGs	22
Figura 8: Diagrama de Venn apresentando a quantidade de genes regulados positivamente e negativamente por IFN- α e IFN- β	23
Figura 9: Hipótese do papel do IFN- α na patogênese do lúpus eritematoso sistêmico	26
Figura 10: Análise da transcrição relativa dos genes induzidos por IFN do tipo I em lesões de pele de pacientes com eritema nodoso hanseniano (ENH).....	43
Figura 11: Análise dos níveis da proteína MX1 em lesões pele durante o eritema nodoso hanseniano (ENH)	45
Figura 12: Análise da expressão de MX1 em células de lesões pele de pacientes com hanseníase	45

Figura 13: Análise da presença de IFN- α por imunofluorescência em lesões de pele de pacientes durante o eritema nodoso hanseniano (ENH)	47
Figura 14: Análise da expressão relativa dos genes induzidos por IFN do tipo I em sangue total de pacientes com eritema nodoso hanseniano (ENH)	50
Figura 15: Nível de IFN do tipo I no soro dos pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7	51
Figura 16: Análise da capacidade do IFN- α de potencializar a NETose induzida por <i>M. leprae</i>	52
Figura 17: Análise da produção do IFN-I por PBMCs de pacientes multibacilares LL/BL e ENH D0	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais características dos IFNs18

Tabela 2: Dados demográficos e clínicos dos pacientes e doadores sadios incluídos no estudo23

Tabela 3: Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes ENH incluídos no estudo40

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ASA	Ambulatório Souza Araújo
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BT	<i>Borderline</i> -tuberculóide
BB	<i>Borderline-borderline</i>
BL	<i>Borderline</i> -lepromatosa
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CpG	Oligonucleotídeo rico em citosina e guanina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ds	Fita dupla
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ENH	Eritema nodoso hanseniano
Hlp	Proteína semelhante a histona
IRF	Fator regulador do interferon
IB	Índice baciloscópico
IFN- γ	Interferon gamma
ISG	Genes estimulados por interferon
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ILB	Índice logaritmo da biopsia
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IL	Interleucina
JAK	Janus quinase
Kg	Quilograma
LL	Forma polar lepromatosa
LPS	Lipopolissacarídeo
μ m	Micrometro
μ L	Microlitros
mg	Miligrama
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pDC	Célula dendrítica plasmocitóide
PQT	Poliqimioterapia
RNA	Ácido ribonucleico
RR	Reação reversa
ss	Fita simples

STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição
TT	Forma polar tuberculóide
TNF	Fator de necrose tumoral
TGF- β	Fator de crescimento tumoral-beta
TLR	Receptor semelhante a Toll
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hanseníase

1.1.1 Epidemiologia, aspectos gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae*. A doença afeta a pele e nervos periféricos, podendo resultar a longo prazo em deformidades irreversíveis e incapacidades físicas no paciente. A transmissão do *M. leprae* ainda é assunto de muita discussão, mas acredita-se que ela ocorra através do contato próximo e prolongado de um indivíduo infectado que não está recebendo tratamento, com outro indivíduo susceptível a doença. A partir desse contato próximo, ocorre a inalação de bacilos contidos na secreção nasal ou bucal, sendo a principal via de transmissão a mucosa nasal. Menos comumente, a transmissão pode ocorrer por erosões da pele e, outras rotas de transmissão, como sangue, transmissão vertical, leite materno e picadas de insetos, também são possíveis (Revisto em Suzuki *et al.*, 2012; revisto em Lastória *et al.*, 2014). Além disso, um estudo em 2011 descobriu que a mesma linhagem genotípica do *M. leprae* foi detectada em alta incidência em tatus selvagens e pacientes com hanseníase no sul dos EUA, sugerindo que a hanseníase pode ser uma zoonose em regiões onde os tatus servem como reservatório (Truman *et al.*, 2011). O bacilo de Hansen pode ficar incubado de 2 a 20 anos ou mais até o aparecimento dos sintomas clínicos da doença. O diagnóstico da hanseníase é confirmado quando se encontram pelo menos 1 dos 3 sinais preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS): perda da sensibilidade de uma região da pele hipopigmentada ou avermelhada; nervo periférico espessado com perda de sensibilidade e presença de bacilos álcool-ácido resistentes em esfregaços de pele (WHO, 2018).

Os esforços para a erradicação de uma doença considerada por muitos autores uma das mais antigas enfermidades conhecidas pelo homem, têm alcançado um grande avanço, conseguindo inclusive sua cura através de um programa terapêutico e, dessa forma, a diminuição do número global de casos de hanseníase de cerca de 12 milhões de doentes na década de 80 para aproximadamente 200 mil casos nos dias atuais (WHO, 2019). Contudo, apesar do constante comprometimento da OMS no combate à hanseníase, a doença ainda se configura um problema de saúde pública em alguns países. Em 2018 foram notificados em 159 países e territórios 208.619 mil

novos casos, e a taxa de detecção de novos casos foi de 2,74 por 100.000 mil habitantes (WHO, 2019). O Brasil contribuiu com 93% dos novos casos de hanseníase na região das Américas, sendo o segundo país com maior número de novos casos registrados (28.875 mil casos em 2018), ficando atrás apenas da Índia, e com uma taxa de detecção de 120.334 mil novos casos, representando 57,68% dos casos de hanseníase no mundo. Esses parâmetros classificam o Brasil como de alta incidência para a doença (WHO, 2019).

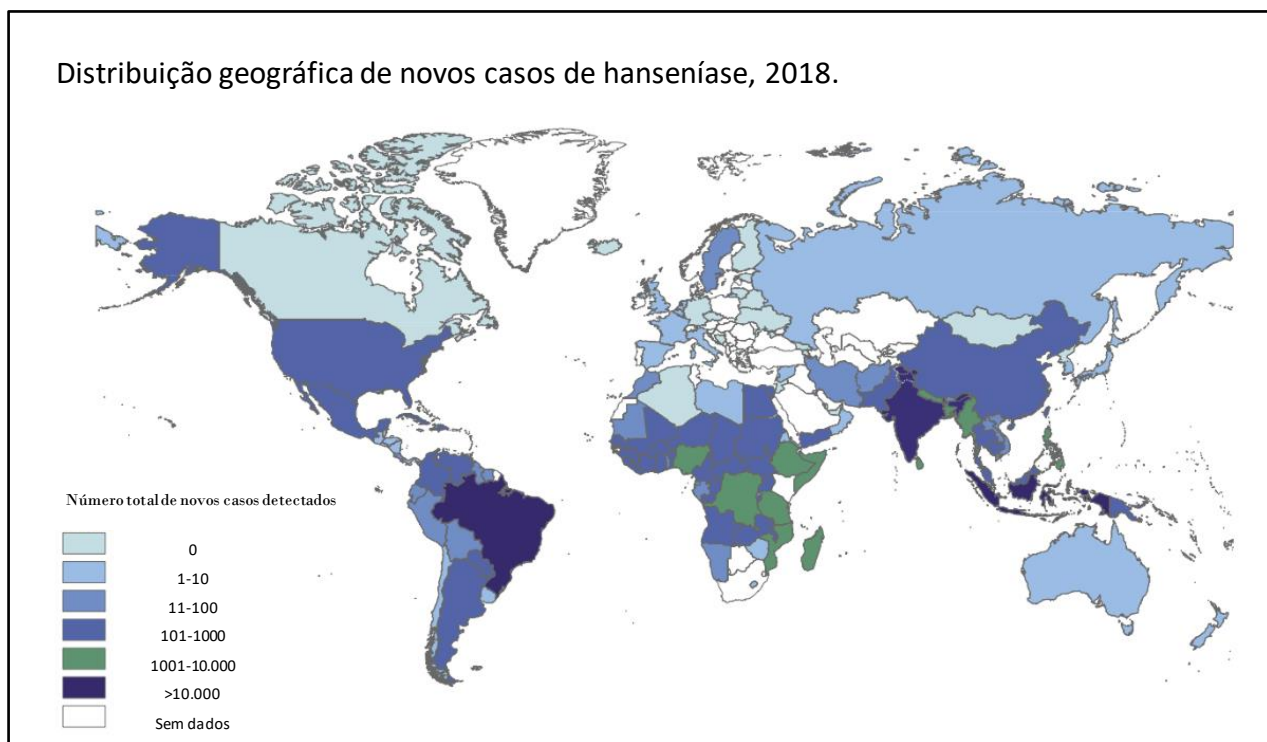


Figura 1: Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase, 2018 (WHO, 2019).

A distribuição de casos novos registrados de hanseníase no Brasil em 2018 por região do País está representada na Figura 2 (www.saude.gov.br). A Região Nordeste do Brasil apresenta o maior número de novos casos, com 11.725 novos casos registrados, seguida da Região Centro-Oeste com 6642 novos casos.

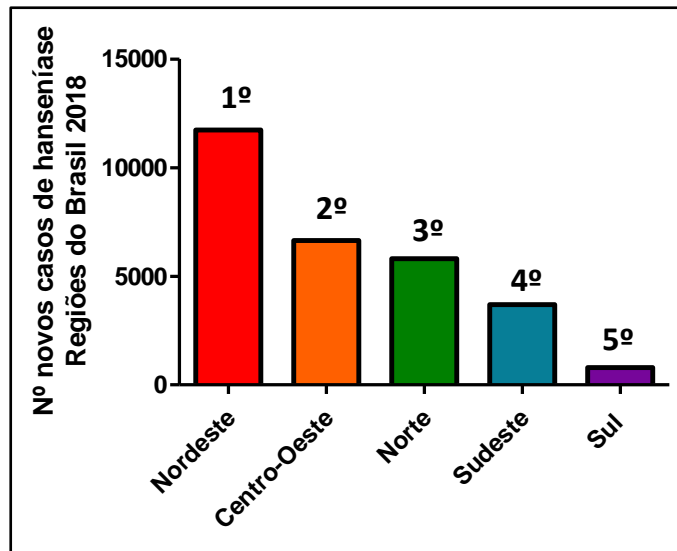


Figura 2: Gráfico de distribuição de novos casos de hanseníase no Brasil em 2018. (Adaptado Ministério da Saúde, 2018).

1.1.2 *Mycobacterium leprae*

M. leprae, também conhecido como bacilo de Hansen, foi descoberto em 1873 pelo médico Gerhard Armauer Hansen na Noruega (Hansen, 1955). O agente etiológico da hanseníase é um patógeno intracelular obrigatório que possui tropismo por macrófagos e células de Schwann (revisto em Scollard *et al.*, 2006). O *M. leprae* é uma bactéria que pertence a ordem dos Actinomycetales, família Micobacteriaceae e gênero *Mycobacterium*, o qual compreende um grande número de microrganismos. É um bacilo em forma de bastonete reto ou levemente curvado, que mede aproximadamente de 1,5 a 8,0 μm de comprimento por 0,2 a 0,5 μm de diâmetro (Figura 3A). Devido ao seu alto teor de lipídeos, cora-se fracamente pela coloração de Gram. São bactérias que quando coradas pela fucsina, resistem à descoloração por uma solução álcool-ácida, sendo assim denominado um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Rees, 1985).

A parede celular do gênero *Mycobacterium* é composta principalmente por um envoltório celular extremamente rico em lipídios complexos na forma de ácidos micólicos e lipoarabinomanana (LAM), que não são encontrados em outras bactérias. E, mais externamente são encontrados glicolipídeos, como o glicolipídeo fenólico-I (PGL-I), encontrado exclusivamente em *M. leprae*, conferindo elevada especificidade imunológica a esse patógeno (revisto em Scollard *et al.*, 2006).

Desde a sua descoberta, ainda é um grande desafio o estudo desse bacilo, pois apesar dos grandes esforços, ainda não é possível realizar o seu cultivo *in vitro*. Em 1960 Shepard demonstrou que ao infectar o coxim plantar de camundongos (Figura 3B) BALB/c com 10^3 a 10^4 bacilos, os camundongos infectados apresentavam uma multiplicação lenta do bacilo e uma lesão localizada da hanseníase durante 9 a 12 meses (Shepard, 1960 e 1962). Ainda com a grande necessidade de obtenção de maiores quantidades de *M. leprae* para fins acadêmicos, a infecção de camundongos atímicos nude Foxn1nu/nu também foi demonstrada como uma fonte de obtenção de grandes quantidades do bacilo. Nesses animais, são inoculados 5×10^7 bacilos no coxim plantar dos camundongos e, após 6 meses, é possível obter $1-5 \times 10^9$ bacilos viáveis. Isso acontece devido a esses animais serem mais suscetíveis a infecção pelo *M. leprae*, em consequência da ausência de linfócitos T (Truman & Krahenbuhl, 2001, Lahiri *et al.*, 2005). Outra fonte de obtenção do *M. leprae* para realização de estudos experimentais é através da utilização do tatu de nove bandas (*Dasypus novencinctus*). Essa espécie de tatu se mostra susceptível a infecção pelo *M. leprae*, sendo possível o crescimento do bacilo de forma disseminada durante 18 a 24 meses, afetando diversos órgãos como baço e fígado. Dessa forma é possível obter grandes quantidades do bacilo e após a purificação, os bacilos podem ser usados vivos por até uma semana ou mortos após irradiação ou sonicação (Kirchheimer & Storrs, 1971; Lloyd & Draper, 1986; Truman, 2005).

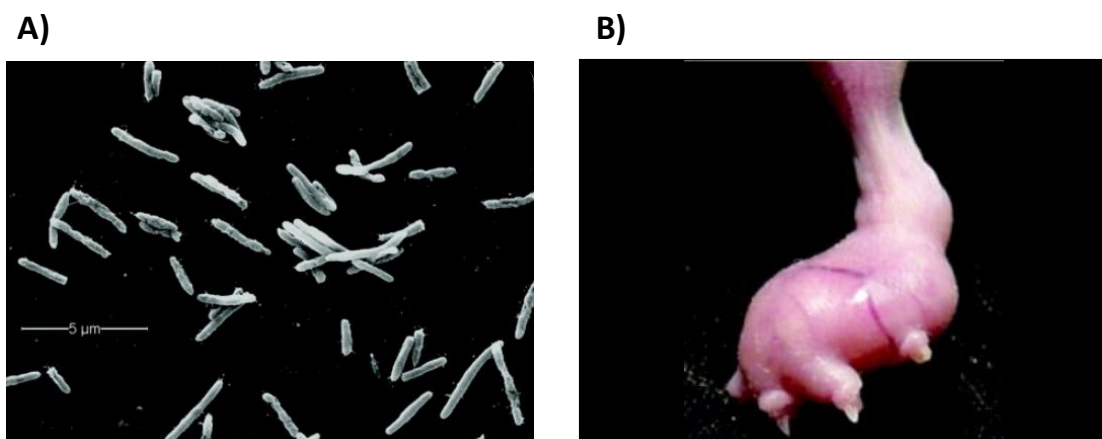


Figura 3: Morfologia do *M. leprae* e seu cultivo em pata de camundongo. A- Microscopia eletrônica de varredura da suspensão de micobactéria obtida de cultivo em pata de camundongo. B- Lesão no coxim plantar na pata de camundongo congenitamente atímico nude com 6 meses de infecção pelo *M. leprae*. (Scollard *et al.*, 2006).

O *M. leprae* foi originalmente purificado a partir das lesões de um paciente multibacilar na Índia e após a purificação o bacilo foi expandido e purificado a partir do fígado de um tatu de nove bandas, que forneceu a fonte de DNA necessária para que em 2001 o genoma do *M. leprae* fosse completamente sequenciado. Dessa forma, foi possível realizar uma análise comparativa do genoma do *M. leprae* com o *M. tuberculosis*, revelando que o *M. leprae* sofreu um processo de evolução redutiva, refletindo em um tamanho menor do seu genoma quando comparado a outras micobactérias. Menos da metade do seu genoma contém genes funcionais e uma grande quantidade de genes inativados, que podem ter sido perdidos por mutação ou pseudogenes. A redução do tamanho do genoma resultou na eliminação de algumas vias metabólicas essenciais, explicando, em parte, a necessidade do metabolismo intracelular e sua incapacidade de crescimento *in vitro* (Cole *et al.*, 2001).

1.1.3 Formas clínicas da Hanseníase

A hanseníase se manifesta através de um espectro de formas clínicas, e isso ocorre devido a capacidade do hospedeiro em desenvolver uma resposta imunológica celular eficiente ou não, contra o *M. leprae*. Estima-se que aproximadamente 95% dos indivíduos que entram em contato com o *M. leprae* apresentam uma resposta imune eficiente contra o bacilo e, por consequência, não desenvolvem a doença. No entanto, esses indivíduos são considerados carreadores do bacilo, podendo facilitar a transmissão da bactéria para outras pessoas. A doença frequentemente se manifesta inicialmente na forma clínica denominada de indeterminada, geralmente caracterizada pelo aparecimento de uma única mancha hipocrômica, com distúrbio da sensibilidade, podendo ser acompanhada de alopecia e/ou anidrose (revisto em Scollard *et al.*, 2006).

A primeira classificação da hanseníase surgiu em 1953, durante o congresso internacional de leprologia na Espanha, a classificação de Madri. Nesta, são utilizados os aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histológicos da hanseníase, dividindo os pacientes em quatro grupos principais: polar-lepromatosa, polar-tuberculóide, a forma indeterminada e a intermediária ou dimorfa (revisto em Talhari *et al.*, 2015). Em 1966, Ridley e Jopling propuseram um novo esquema de classificação para identificar as formas clínicas dos pacientes. Nesse esquema de classificação, os critérios utilizados para identificação do paciente se baseiam em

critérios clínicos, bacteriológicos e, principalmente, imunológicos e histopatológicos. De acordo com os critérios apresentados, os pacientes são classificados utilizando as designações TT (tuberculóide-tuberculóide) e LL (lepromatoso-lepromatoso) para os grupos polares e BT (*borderline*-tuberculóide), BB (*borderline*-*borderline*) e BL (*borderline*-lepromatoso) para os grupos intermediários (Ridley e Jopling, 1966) (Figura 4).

A hanseníase TT é considerada a forma clínica com maior resistência à infecção e é caracterizada por uma intensa resposta imune celular contra o *M. leprae*, apresentando apenas 1 lesão bem demarcada com hipopigmentação central e hipoestesia e a presença de poucos bacilos (Ridley e Jopling, 1966; revisto em Talhari *et al.*, 2015). Os pacientes do polo TT apresentam uma resposta celular do tipo Th1, com produção de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e interferon gama (IFN- γ) que ativam mecanismos microbicidas nos macrófagos. As lesões do polo TT apresentam um influxo de células T CD4⁺ e granulomas bem formados (Modlin *et al.*, 1988; Foss, 1997; revisto em Misch *et al.*, 2010). Em contrapartida, os pacientes do polo LL apresentam a forma mais disseminada da doença, com numerosas lesões mal demarcadas, que com a progressão da doença podem se tornar elevadas ou nodulares e podem surgir em todas as partes do corpo, e os pacientes também apresentam alta carga bacilar (índice bacteriológico – IB). O polo LL é caracterizado pela produção da interleucina 10 (IL-10) e do fator de transformação do crescimento (TGF- β), que regulam negativamente as respostas do tipo Th1, além da intensa produção de anticorpos, que não é eficaz na eliminação do patógeno. As lesões do polo lepromatoso apresentam uma maior proporção de células T CD8⁺ em relação a células T CD4⁺ e macrófagos com aspecto espumoso com grande número de bacilos no seu interior (Modlin *et al.*, 1988; revisto em Misch *et al.*, 2010; revisto em Souza *et al.*, 2017).

A maioria dos pacientes com hanseníase desenvolve as formas clínicas classificadas como *borderline* (BT, BB, BL). Os pacientes BB são extremamente instáveis e raros, e podem evoluir para as formas TT ou LL rapidamente (ref). Apresentam lesões caracterizadas por placas infiltradas, com bordas internas bem definidas e bordas externas indefinidas, podendo atingir a pele normal em algumas áreas, frequentemente também podem apresentar pápulas e nódulos. Esse grupo apresenta índice bacteriológico (IB) que pode variar de 2 a 4. Os pacientes BT apresentam lesões que são semelhantes às do polo tuberculóide, no entanto, são

maiores e em maior quantidade. As lesões podem variar de forma, cor e tamanho no mesmo paciente, a cor pode variar de hipocrômica a vermelha, e podem apresentar pequenas lesões chamadas satélites, localizadas próxima de uma lesão maior que se estende desde as bordas. O grupo BT, apresenta um IB que geralmente não excede 2. Por último, os pacientes BL apresentam características semelhantes ao polo lepromatoso, sendo acometidos por lesões maculares hipopigmentadas, espalhadas por todo o corpo igualmente. Durante a evolução da doença, a lesão aumenta de tamanho, tornando-se eritematosa e infiltrada, com bordas irregulares que invadem a pele normal. Esses pacientes apresentam baciloscopia altamente positiva (Revisto em Virmond *et al.*, 2015; revisto em Talhari *et al.*, 2015).

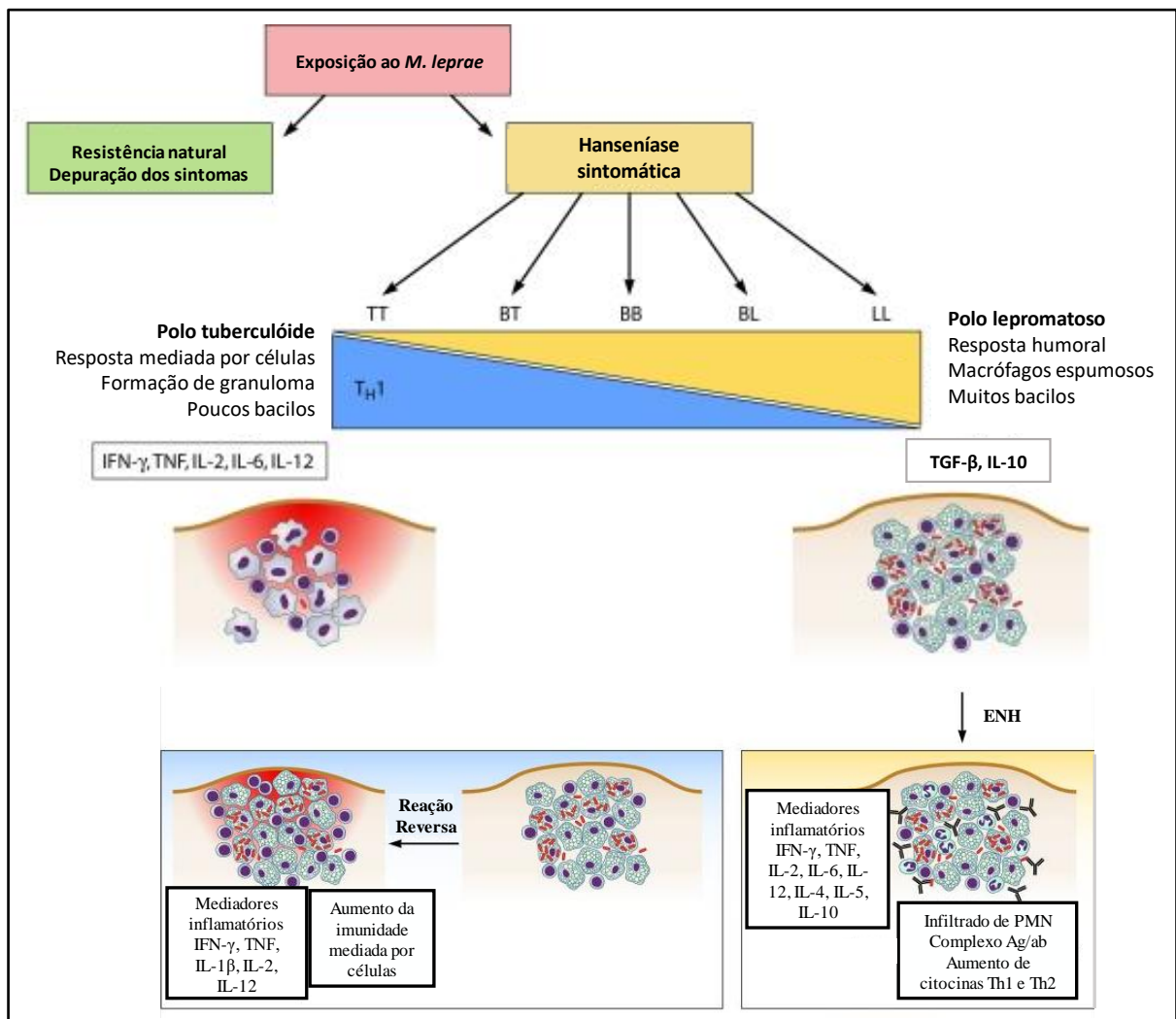


Figura 4: O espectro da hanseníase e possíveis mecanismos de dano tecidual. As manifestações da hanseníase são classificadas ao longo de um espectro clínico de tuberculóide-tuberculóide (TT), *borderline*-tuberculóide (BT), *borderline-borderline* (BB), *borderline*-lepromatoso (BL) e lepromatoso-lepromatoso (LL). Cada polo está associado a um perfil imunológico celular ou humoral característico.

A reação reversa mediada pelo aumento da imunidade mediada por células e citocinas associadas ao processo inflamatório. O eritema nodoso hanseniano mediado por um intenso infiltrado de neutrófilos, complexo antígeno-anticorpo e aumento de citocinas associadas a resposta Th1 e Th2. (Adaptado de Misch *et al.*, 2010).

Antes, durante ou após o tratamento poliquimioterápico podem ocorrer episódios inflamatórios agudos, conhecidos como episódios reacionais, podendo ser classificados em reação do tipo 1 [reação reversa (RR)], ou a reação do tipo 2 [eritema nodoso hanseniano (ENH)] (Figura 4). Os episódios reacionais são uma complicação extremamente grave da hanseníase, independente do momento em que aconteça, e podem acometer de 20% a 50% de todos os pacientes diagnosticados com hanseníase. As reações são consideradas emergências médicas, podendo aumentar muito a morbidade relacionada a doença, por isso é de extrema importância identificar o tipo de reação e realizar o tratamento específico para reduzir a carga de incapacidade na hanseníase (Revisto em Kamath *et al.*, 2014).

A reação reversa acomete principalmente pacientes com as formas clínicas BT, BB e BL, sendo resultado da ativação da imunidade celular e aumento da produção das citocinas TNF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2 e IL-12, onde há uma inflamação exacerbada na pele e comprometimento do nervo periférico, levando a incapacidades físicas permanentes, como perda da sensibilidade e alterações motoras (Yamamura *et al.*, 1992; Nery *et al.*, 2013). Os pacientes RR são caracterizados clinicamente pelo aumento da inflamação em lesões pré-existentes, lesões anteriormente hipocrômicas tornam-se vermelhas, sensíveis, intumescidas, e máculas tornam-se placas. As lesões também se tornam elevadas e mais definidas e podem ulcerar, podendo surgir novas lesões com as mesmas características. Edema de extremidades e faces podem surgir, além de edemas nas mãos e nos pés que são consideradas peças chave no diagnóstico da RR. Os nervos mais comumente acometidos são: ulnar, mediano, tibial posterior, fibular comum, radial e facial (Revisto em Souza, 1997; Nery *et al.*, 2013).

O ENH acomete pacientes com as formas clínicas BL e LL, que apresentam sintomas sistêmicos e pequenos nódulos avermelhados espalhados pelo corpo, isso tudo acompanhado do comprometimento dos nervos periféricos. Nesses pacientes com ENH ocorre uma alta produção das citocinas TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-8 que são apontadas como um fator relevante para o desenvolvimento do ENH, além de um intenso infiltrado de neutrófilos no tecido. Esses pacientes apresentam comprometimento de diversos órgãos, além da pele. Apesar de muitos estudos terem

como foco a compreensão mais profunda sobre os mecanismos que desencadeiam as reações, ainda é difícil determinar a causa dos episódios reacionais (Kahawita & Lockwood *et al.*, 2008).

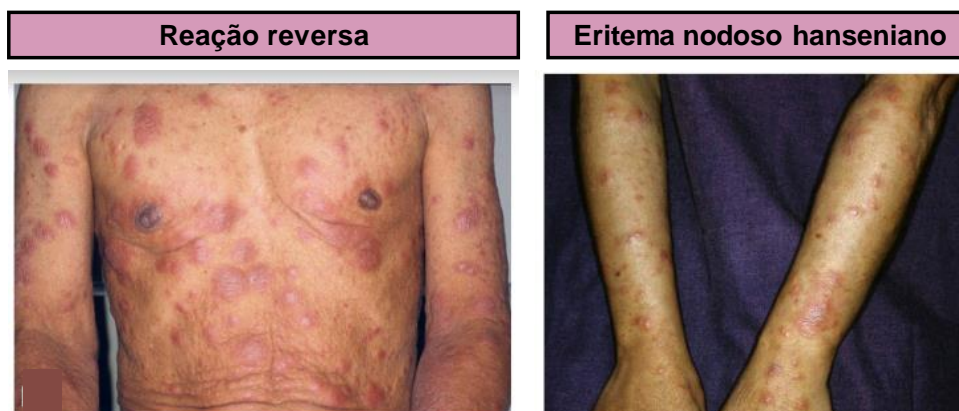


Figura 5: Reação reversa e eritema nodoso na hanseníase. Paciente com placas eritematosas causadas pela reação reversa. Ao lado paciente com eritema nodoso hanseniano apresentando pápulas, placas e nódulos. (Adaptado de Kamath *et al.*, 2014).

1.1.4 Diagnóstico e tratamento

O diagnóstico da hanseníase é de extrema importância e deve ser realizado seguindo todos os critérios estabelecidos pela OMS, para que se prossiga com o tratamento adequado dos pacientes. A hanseníase possui um diagnóstico essencialmente clínico, que avalia sinais e sintomas dermatológicos e neurológicos, baseado na história de evolução da lesão, epidemiologia e no exame físico. Inicialmente o médico irá realizar o exame físico da pele e dos nervos periféricos, observando os nervos da face. Em seguida irá analisar se há espessamento visível ou palpável dos nervos do pescoço, pés, punho, cotovelo, joelho e tornozelo, observando se eles estão visíveis, assimétricos, endurecidos, dolorosos ou com sensação de choque. Após, irá realizar uma busca por toda a pele do corpo do paciente a procura de lesões. Em seguida é realizado o teste de sensibilidade térmica, dolorosa e tátil, nas lesões de pele não elevadas (manchas) ou elevadas (placas, nódulos); áreas de pele secas ou regiões com alteração de sensibilidade que o próprio paciente relatou (Ministério da Saúde, 2017).

Apesar do diagnóstico ser essencialmente clínico, se houver alguma dúvida do diagnóstico é recomendada a realização da baciloscopia e exame histopatológico. A baciloscopia consiste na coleta de esfregaços dérmicos (linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e lesões) e posterior contagem dos bacilos através da coloração pelo método de Ziehl-Neelsen (Ministério da Saúde, 2017). Já o exame histopatológico, consiste na coleta de biópsia de pele ou ramos sensitivos dos nervos periféricos, que será enviado para um laboratório de patologia para realizar a coloração de Wade para identificação do bacilo (Wade, 1952).

Existem outros métodos para auxiliar o diagnóstico preciso da hanseníase, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), que é um método com alta sensibilidade e especificidade para a detecção de mínimas quantidades do DNA do *M. leprae*. Essa técnica é amplamente utilizada para diagnóstico diferencial em países desenvolvidos, embora não possa determinar se organismos viáveis estão presentes porque o DNA pode persistir por muito tempo após a morte dos microrganismos (Martinez *et al.*, 2006 e 2009; Suzuki *et al.*, 2010). Mais um teste utilizado é o ensaio imunoenzimático (ELISA [Enzyme-linked immunosorbent assay]), esse ensaio se baseia na detecção de imunoglobulinas IgM contra o glicolípido fenólico I (PGL - I) do *M. leprae*. A detecção de anticorpos anti- PGL-I tem sido foco de muitos trabalhos, onde a análise da soropositividade indica o grau de exposição ao *M. leprae*. Esses estudos demonstram que pacientes hansenianos no pólo lepromatoso produzem grandes quantidades de imunoglobulinas do tipo IgM reagindo contra este antígeno, apresentando soropositividade de 80-100%, enquanto pacientes no pólo tuberculóide apresentam níveis baixos de detecção de imunoglobulinas específicas, com soropositividade de 30-60% (Revisto em Moura, 2008). É muito importante que os resultados dos exames auxiliares sejam correlacionados com a clínica, para que não ocorra erro no diagnóstico e classificação do paciente.

O tratamento da hanseníase é realizado com poliquimioterapia (PQT). A PQT foi proposta pela primeira em 1984, por um comitê de especialistas da OMS e, desde 1995 o tratamento é fornecido pela OMS gratuitamente para todos os países endêmicos. A combinação dos fármacos usados na PQT depende da classificação do paciente. Para pacientes multibacilares (formas LL, BL e BB), o tempo de tratamento é de 12 meses, e são administradas ao paciente uma dose mensal de 600 mg de Rifampicina, 100 mg de Dapsona e de 300 mg de Clofazimina. Além disso, o paciente toma 100 mg de Dapsona e 50 mg de Clofazimina diariamente. Para os pacientes paucibacilares (formas BT e TT), o tempo de tratamento é de 6 meses, e são administradas uma dose mensal de 600 mg de Rifampicina, e 100 mg de Dapsona diariamente (Gallo *et al.*, 1997; Ministério da Saúde, 2017; WHO, 2019).

O tratamento da reação reversa ocorre pelo uso do corticóide prednisona, sendo recomendado na dose de 1-2 mg/kg ao dia até que haja melhora clínica, e para pacientes que apresentam hipertensão ou cardiopatia é recomendada a dexametasona 0,15 mg/kg ao dia. Para o tratamento de pacientes com ENH, é administrado a talidomida, na dose de 100 a 400 mg ao dia, por via oral, de acordo com a gravidade do caso. Como opção, para mulheres em idade fértil, é utilizado a pentoxifilina, na dose de 400 mg três vezes ao dia (Nery *et al.*, 2013; Ministério da Saúde, 2017).

1.2 Eritema nodoso hanseniano (ENH)

O ENH ocorre devido à uma complicação imunológica grave da hanseníase multibacilar e acomete de 5-10% dos pacientes BL e 50% dos pacientes LL, que apresentam alta carga bacteriana (IB >4). Essa complicação na hanseníase pode ocorrer a qualquer momento do tratamento com a poliquimioterapia, mas é mais comum após o 1^a ano do início do tratamento. Além desses fatores para desenvolver o ENH, a gravidez, a lactação, a puberdade, a infecção intercorrente, a vacinação e o estresse psicológico também foram considerados como fatores de risco para o ENH, mas essas associações ainda não foram confirmadas em estudos prospectivos. Geralmente o ENH pode durar de alguns dias a semanas, no entanto, alguns pacientes podem desenvolver reações recorrentes (Pocaterra *et al.*, 2006; Kahawita & Lockwood *et al.*, 2008).

Em pacientes ENH, as lesões pré-existentes não sofrem alterações, ocorre o aparecimento de novas lesões, onde a pele, aparentemente normal, é acometida por pápulas, nódulos e placas, doloridos e tensos ao toque, de coloração rosada, com margens não definidas, que evoluem com descamação central, e podem tornar-se hemorrágicas, chegando a ulcerar. As lesões apresentam uma distribuição simétrica, bilateral e difusa, e normalmente atinge face, tronco, e superfícies extensoras das extremidades superior e inferior. Além dessas características, os pacientes apresentam sintomas sistêmicos como febre, mal-estar e inflamação que produzem irite, artrite, neurite e linfadenite (Revisto em Souza, 1997; revisto em Kamath *et al.*, 2014). Um estudo em 2015 avaliou as características clínicas de 289 pacientes com ENH, localizados no Brasil, Índia, Etiópia, Nepal e Filipinas. Nesse estudo foi relatado que 96,5% dos pacientes têm algum grau de dor e, usando a escala semi-quantitativa *Wong-Baker Pain Rating Scale*, também puderam demonstrar que a dor não era apenas frequente, mas também era grave em 58,5% dos pacientes. A avaliação desses pacientes revelou que as dores são mais frequentes na pele, articulações, ossos, dedos, músculos e nervos. Foi demonstrado que 50% da população do estudo apresentava comprometimento da função nervosa, que foi associado com a duração do ENH. Esse estudo evidencia o ENH como uma intercorrência grave, devido à sua natureza dolorosa e alto comprometimento neurológico, que necessita de intervenções rápidas e eficazes (Walker *et al.*, 2015).

A histopatologia das lesões do ENH é classicamente caracterizada por um intenso infiltrado de neutrófilos nas camadas mais profundas da derme e tecido subcutâneo. Eosinófilos, linfócitos e plasmócitos são encontrados junto com os neutrófilos e alguns macrófagos espumosos contendo um elevado número de bacilos também podem ser observados. O edema da derme, vasculite e angiogênese também são frequentemente encontrados. As células que constituem o infiltrado inflamatório variam à medida que a lesão evolui. Dessa forma, o número de linfócitos e plasmócitos aumenta e o número de neutrófilos e eosinófilos diminui (Kahawita & Lockwood *et al.*, 2008; 2008; revisto em Schmitz *et al.*, 2019).

Pacientes diagnosticados com ENH necessitam de tratamento imediato, para prevenir as incapacidades físicas permanentes e aliviar seu estado de dor. Na maioria dos casos, devido ao ENH se tornar uma condição crônica, os pacientes necessitam de tratamento por tempo prolongado. O principal tratamento utilizado consiste na administração da talidomida, que é extremamente eficaz com remissão dos sintomas do ENH em poucos dias após iniciado o tratamento (Costa *et al.*, 2018). No entanto, os mecanismos de ação para a eficácia da talidomida ainda não são bem compreendidos. Estudos abordam que o mecanismo chave para seu efeito é a diminuição da citocina TNF (Revisto em Legendre *et al.*, 2012; revisto em Kamath *et al.*, 2014). Um trabalho utilizando monócitos humanos estimulados *in vitro* revelaram um efeito supressor da talidomida sobre a citocina TNF induzida pelo receptor Toll-like 4 (TLR4) para lipopolissacarídeo (LPS) (Sampaio *et al.*, 1991). Recentemente, novos estudos identificaram o cereblon como um alvo direto da talidomida. Utilizando embriões de peixe-zebra como modelo animal, foi possível identificar que embriões tratados com talidomida exibem defeitos no seu desenvolvimento. E para confirmar que o cereblon é realmente o alvo da talidomida, foi construído um mutante deficiente na ligação da talidomida ao cereblon e, ao tratar esses mutantes com talidomida não ocorreu defeitos no desenvolvimento do peixe-zebra, concluindo então que o cereblon é um alvo legítimo para a teratogenicidade da talidomida neste modelo (Ito *et al.*, 2010). Além disso, a ligação ao cereblon tem sido destacada como alvo para as propriedades imunossupressoras da talidomida (Revisto em Ito *et al.*, 2016).

A talidomida é um fármaco muito conhecido por seus efeitos teratogênicos. Devido a isso, o uso da talidomida é proibido para mulheres em idade fértil. Apesar da sua eficácia, a talidomida não está disponível em muitos países endêmicos de hanseníase ou é rigorosamente limitado devido à baixa disponibilidade, custo e preocupações sobre a teratogenicidade. Portanto, para esses pacientes é recomendado o uso de corticosteróides orais, como a prednisona. A pentoxifilina e a clofazimina também são utilizadas como fármacos alternativos (Kahawita & Lockwood *et al.*, 2008; revisto em Kamath *et al.*, 2014; Walker *et al.*, 2015).

Até os dias atuais é motivo de grande discussão os fatores que levam ao desencadeamento e manutenção do processo inflamatório durante o ENH. Por muito tempo a hipótese mais disseminada era que o ENH é um fenômeno mediado por complexos imunes. Vários estudos foram realizados investigando complexos-imunes no ENH (Wemambu *et al.*, 1969; Moran *et al.*, 1972; Murphy *et al.*, 1986). Wemambu e

colaboradores (1969) demonstraram por meio da imunofluorescência direta a presença de depósitos granulares de imunoglobulina e complemento em uma distribuição perivascular na derme em áreas onde há a presença de um infiltrado de neutrófilos em lesões ENH, e isso não foi visto em lesões de pacientes LL. Em alguns casos foram encontrados nesses depósitos a presença de antígenos específicos de *M. leprae*. Esses achados fornecem evidências de uma associação entre o complexo imune e o ENH, no entanto eles não comprovam que os complexos imunes são o gatilho que induz o desenvolvimento do ENH (Wemambu *et al.*, 1969; Kahawita & Lockwood *et al.*, 2008).

Recentemente, um estudo identificou a diminuição da proteína C1q no soro de pacientes ENH antes do tratamento antirreacional. Em contrapartida foi identificado o aumento da transcrição do mRNA de C1q no sangue periférico, e também foi visto um aumento de C1qA e C1qC em amostras de lesão cutânea de pacientes ENH. Sabe-se que para a formação de complexos imunes, é necessário que a proteína C1q dê início a via clássica do sistema complemento para formação de complexos imunes. Logo esses dados sugerem que C1q pode estar sendo utilizado para formação de complexos imunes, por isso seus níveis são diminuídos na circulação de pacientes ENH, e sua transcrição gênica aumentada está diretamente correlacionada com a patologia do ENH (Negera *et al.*, 2018).

Já foi demonstrado que pacientes ENH e LL apresentam uma porcentagem semelhante de anticorpos contra o *M. leprae*, como anti-PGL-I, anti-LAM e anti-ag85. No entanto, após o tratamento com prednisona o grupo ENH tem uma diminuição mais acentuada que o controle LL tratado com a PQT. Além disso, pacientes com ENH agudo exibem uma porcentagem maior de anti-PGL-I que pacientes com ENH crônico (Negera *et al.*, 2018).

As células T reguladoras são extremamente importantes para manter a tolerância do sistema imunológico a autoantígenos. A desregulação da proporção de células T reguladoras é associada a doenças autoimunes mediadas por complexos imunes. Recentemente foi identificada uma diminuição de células T CD4 reguladoras em pacientes ENH, em comparação com pacientes LL. Já a proporção de células T CD8 foi semelhante entre os grupos. Pacientes ENH apresentam menor taxa de células T CD4⁺ FoxP3, comparados ao grupo controle LL. O tratamento com prednisona leva a supressão de células T CD4⁺, mas não de células T CD8⁺. Além disso, o aumento de células T CD4 produtoras de IL-17 foi associado ao ENH. Assim,

acredita-se que pacientes ENH possuem uma capacidade prejudicada de regular a ativação excessiva do sistema imune via células T CD4⁺, resultado dos baixos níveis de células T reguladoras (Negera *et al.*, 2017; Negera *et al.*, 2017).

Vários estudos mostraram que as células B de memória ativada aumentam em pacientes com crises de lúpus eritematoso sistêmico (LES) e artrite reumatóide. Já foi visto que o total de células B, células B de memória e células B maduras não foi diferente entre os grupos ENH e LL antes do tratamento. Células B virgens estão diminuídas em pacientes ENH, e células B de memória ativada estão mais elevadas em pacientes ENH. Dessa forma, os anticorpos poderiam interagir com os antígenos de *M. leprae* e, assim, formar o excesso de complexos imunes. E também as células B ativadas podem agir como células apresentadoras de antígeno, apresentando antígenos do *M. leprae* para células T. Essa resposta pode se tornar exacerbada e causar danos nos tecidos como observamos durante o ENH (Negera *et al.*, 2017).

Um estudo utilizando amostras de pacientes com ENH demonstrou um aumento nas concentrações séricas de TNF e IL-1 β e, desde então, essas citocinas têm sido associados aos episódios ENH (Sarno *et al.*, 1991). Concentrações elevadas de IFN- γ e IL-6 foram encontrados em soro de pacientes com ENH, além do aumento do RNA mensageiro de IFN- γ e IL-6 em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e em biópsias de pele de pacientes ENH. O IFN- γ parece ter papel importante na patogênese do ENH, pois um estudo demonstrou que a injeção intradérmica repetida desta citocina induz o desenvolvimento do ENH (Sampaio *et al.*, 1992; Moraes *et al.*, 1999; Iyer *et al.*, 2007). Por outro lado, a participação de IL-1 β no ENH foi confirmada em trabalho mais recente (Lee *et al.*, 2010). Neste estudo, através de uma análise de expressão gênica por microarranjo, verificou-se que IL-1 β e vias ativadas por esta citocina que auxiliam na migração celular, como a E-selectina, estão positivamente reguladas na lesão de pele ENH. Os neutrófilos são um marco histológico em lesões ENH, e o recrutamento destas células para a lesão envolve a regulação positiva da E-selectina nas células endoteliais. Assim, IL-1 β estaria contribuindo para a expressão aumentada de E-selectina em lesões de ENH e subsequente ligação dos neutrófilos no endotélio.

Dados recentes do nosso grupo demonstraram que a via de imunidade inata ativada pelo reconhecimento de DNA via receptor TLR-9 tem importante envolvimento no processo inflamatório observado no ENH. Neste estudo foi observado o aumento

na expressão de TLR-9, tanto nas lesões quanto em células mononucleares circulantes de pacientes ENH, assim como concentrações circulantes elevadas de potenciais ligantes de TLR-9 (a proteína Hlp -do inglês histone-like protein- de origem micobacteriana e complexos DNA-histona humana). Ensaios *in vitro* utilizando células mononucleares de sangue periférico mostraram que esta via é majoritária na indução de citocinas pró-inflamatórias durante o ENH, uma vez que o bloqueio do reconhecimento de *M. leprae* via TLR-9 através de um antagonista específico deste receptor inibiu de forma significativa a secreção de TNF, IL-6 e IL-1 (Dias *et al.*, 2016). Dando continuidade a este trabalho, nosso grupo observou que os neutrófilos de pacientes ENH apresentam taxas aumentadas de NETose, indicando que as armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, *Neutrophil Extracellular Traps*) liberadas por este processo representam uma fonte importante dos níveis circulantes elevados de DNA endógeno detectados nesses pacientes. Em conjunto, estes resultados indicam que a ativação de TLR-9 durante o ENH é uma via de imunidade inata importante na geração de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a inflamação sistêmica observada durante este episódio reacional (Silva *et al.*, 2019). Uma importante consequência da ativação de TLR-9 é a produção de IFN-I pelas células dendríticas plasmocitóides (pDCs), principais produtoras destas citocinas no organismo. Na última década, inúmeras evidências vêm demonstrando o envolvimento de IFN-I na patogênese de doenças autoimunes inflamatórias crônicas com intercorrências de episódios agudos como o lúpus eritematoso sistêmico (LES) (Barrat & Su, 2019). A hanseníase, especialmente o ENH, compartilha semelhanças com o LES e doenças reumáticas, ocorrendo com alguma frequência confundimento no diagnóstico entre estas patologias na clínica médica (Horta-Baas *et al.*, 2015). Assim, pelo exposto acima, levantamos a hipótese de que o IFN-I possa igualmente ter um papel importante na patogênese do ENH.

1.3 Interferon do tipo I

Os interferons foram descobertos em 1957 por Isaacs e Lindenmann. Essas citocinas foram identificadas inicialmente como moléculas solúveis produzidas em resposta à infecção pelo vírus Influenza A, e ficaram conhecidas como um fator de interferência para o processo de replicação viral. Essas citocinas são sintetizadas por mamíferos, aves, répteis e peixes. Os IFNs foram as primeiras citocinas descobertas, fornecendo material para diversos estudos sobre função, via de sinalização, evolução e estrutura de outras citocinas (Isaacs e Lindenmann, 1957; revisto em Bandurska *et al.*, 2014).

De acordo com propriedades físico-químicas, as semelhanças estruturais e atividades biológicas, os IFNs são divididos em três famílias distintas (Tabela 1). A família do IFN do tipo I é uma família de citocinas de múltiplos genes que codificam 13 subtipos IFN- α em seres humanos, um único IFN- β e alguns genes únicos mal definidos (IFN- ω , κ , ϵ , τ , τ , δ , ν). A família de IFN de tipo II consiste em um produto de um único gene, IFN- γ (Bonjardim *et al.*, 2009) e, a família do IFN do tipo III compreende IFN- λ 1, IFN- λ 2 e IFN- λ 3, (também conhecidos como IL-29, IL-28A e IL-28B, respectivamente) e o IFN- λ 4 (Revisto em Pestka *et al.*, 2004). Os três tipos de interferon atuam através de receptores específicos. Dos outros IFNs distinguem-se principalmente pelo tipo de receptor estimulado e por propriedades físico-químicas únicas, como a capacidade de manter a estabilidade da estrutura a 65° C e um pH de 2. Os membros da família do IFN do tipo I podem ser sintetizados em resposta a infecções por vírus, bactérias e parasitas (revisto em Bandurska *et al.*, 2014).

Tabela 1: Principais características dos IFNs.

Interferon tipo	I	II	III
Tipos	IFN- α IFN-B IFN- ω , κ , ϵ , τ , δ , ν	IFN- γ	IFN- λ 1, IFN- λ 2, IFN- λ 3 e IFN- λ 4
Localização no cromossomo	Cromossomo 9, região 2, banda 1.	Cromossomo 12	Cromossomo 19
Receptor	IFNAR1 e IFNAR2	IFNGR1 e IFNGR2	IFN- λ R1 e IL-10R2
Ocorrência	A maioria dos vertebrados (mamíferos, algumas aves e peixes).	Mamíferos, alguns peixes, anfíbios e aves.	Humanos e outros mamíferos.
Fator indutor	Vírus, bactérias e parasitas.	Antígenos e mitógenos.	Vírus.

Fonte: Adaptado de Bandurska *et al.*, 2014.

1.3.1 Via de sinalização do IFN do tipo I

As citocinas da família do IFN do tipo I podem ser produzidas por quase todas as células do corpo, com um destaque especial para as pDCs, que apresentam uma capacidade extraordinária de produzir estas citocinas (revisto em Barrat & Su, 2019). Após estimulação viral, microbiana ou por indutores químicos, ocorre a estimulação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Estes receptores estão localizados na superfície celular, no citosol ou nos compartimentos endossômicos. Inicialmente, o vírus da Influenza A foi identificado como indutor da produção do IFN, mas a síntese do IFN pode ocorrer pelo reconhecimento de qualquer vírus com genoma constituído de ácido ribonucléico (RNA) ou de ácido desoxirribonucléico (DNA), ácidos nucleicos microbianos, lipídios, lipopolissacarídeos, proteínas e protozoários. Dessa maneira, os PRRs reconhecem e desencadeiam a indução de IFNs. Dentre os PRRs, os principais são os receptores do tipo toll (TLRs) (Revisto em Borden *et al.*, 2007; revisto em McNab *et al.*, 2015) (Figura 6). No caso das pDCs, os receptores de reconhecimento de ácidos nucleicos TLR7/TLR9 têm papel preponderante na ativação e produção de IFN-I por essas células (revisto por Kim *et al.*, 2015; Barrat *et al.*, 2019)

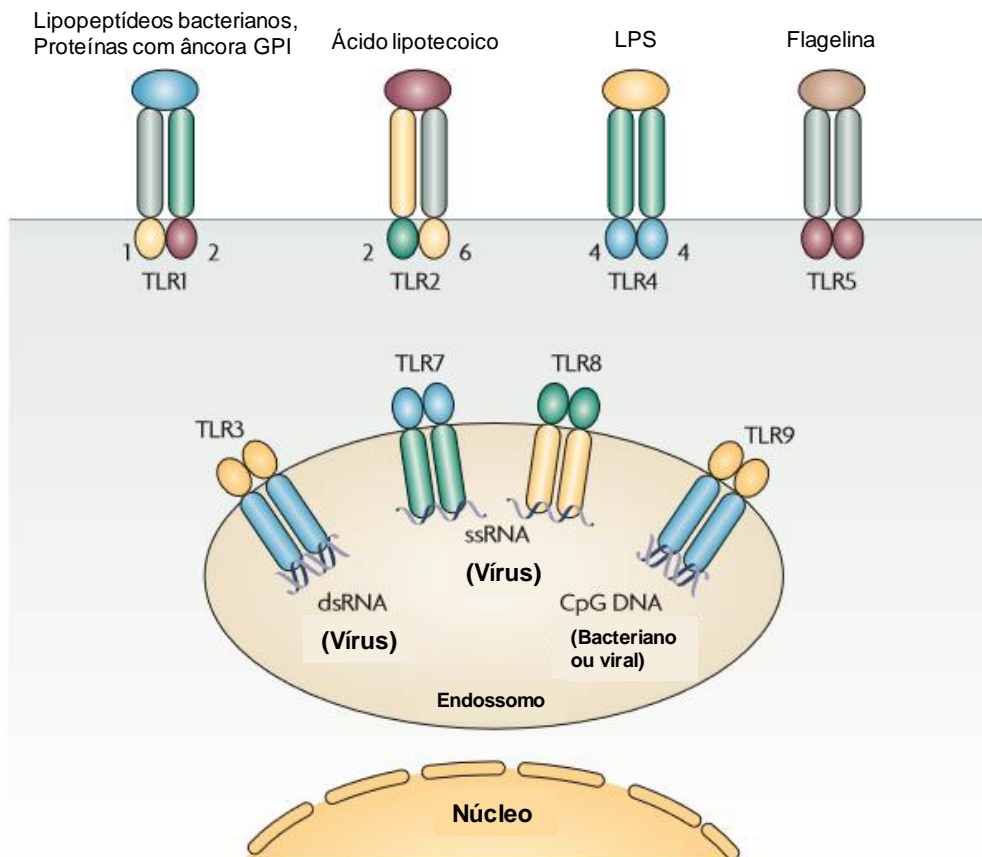


Figura 6: Receptores Toll-like (TLRs) e seus ligantes. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 e TLR6 estão localizados na superfície celular. Seus domínios extracelulares ligam-se a produtos microbianos específicos que atuam como ligantes e os domínios intracelulares sinalizam através de proteínas de sinalização citoplasmáticas específicas. Vários outros TLRs, como TLR3, TLR7/8 e TLR9, reconhecem ácidos nucleicos específicos que são frequentemente produzidos por vírus. Eles estão ligados na membrana endossomal com os domínios de ligação dentro do lúmen e os domínios de sinalização no citoplasma. Eles também reconhecem RNA de fita dupla (ds), RNA de fita simples (ss) ou sequências de CpG contendo dsDNA. GPI, glicosilfosfatidilinositol; LPS, lipopolissacarídeo. (Adaptado de Borden *et al.*, 2007).

O IFN do tipo I se ligam e sinalizam através de um receptor transmembranar heterodimérico composto das subunidades IFNAR1 e IFNAR2 (Figura 7). A ligação no seu receptor IFNAR ativa a proteína tirosina quinase Janus quinase 1 (JAK1) e a tirosina quinase 2 (TYK2) que está associada ao receptor. Na via de sinalização mediada por IFN- α/β , após a ativação dos receptores, as JAKs sofrem auto-fosforilação e trans-fosforilação para aumentar sua atividade, e depois fosforilam os IFNARs, e finalmente, os STATs (STAT1 e STAT2) que estão presentes no citosol, levando à dimerização, translocação nuclear e ligação destas moléculas ao fator regulador do IFN (IRF9) para formar o complexo de genes estimulados por IFN (ISG)

fator 3 (ISGF3). Esse complexo então se liga a elementos de resposta estimulados por IFN em promotores de ISGs, levando à ativação da transcrição de ISGs. Desta forma, IFN- α/β induz a expressão de ISGs (Revisto em Pestka *et al.* 2004; revisto em Borden *et al.*, 2007; revisto em Bandurska *et al.*, 2014).

Os ISGs são um grupo diverso de mais de 300 genes, sendo estes os mediadores dos efeitos antivirais e outras atividades biológicas. Os estudos dos mecanismos de ação dos ISGs resultaram em descobertas fundamentais referentes ao controle da tradução, regulação da estabilidade e edição do RNA e transporte proteico. Dentre uma grande variedade de ISGs, a função da maioria ainda não é bem estabelecida, necessitando de mais estudos que tenham como foco identificar o papel de cada ISG na resposta imune (Revisto em Borden *et al.*, 2007; revisto em Bandurska *et al.*, 2014).

Alguns ISGs apresentam suas funções bem caracterizadas, principalmente aqueles que possuem atividade antiviral. O gene oligoadenilato sintetase (OAS) ativa a ribonuclease L (RNASEL), que cliva regiões de cadeia simples de RNA, inibindo a replicação de diversos vírus. Além disso, a degradação do mRNA e rRNA pelo RNASEL danifica o mecanismo da célula hospedeira que é necessário para a replicação viral e pode resultar em apoptose, contribuindo para as ações antivirais e antitumorais desse gene. A proteína quinase R (PKR ou EIF2AK2) medeia o controle da tradução pela fosforilação do fator de iniciação da síntese de proteínas eIF2 α . Esses eventos levam a uma inibição completa da síntese de proteínas que bloqueia a replicação viral e amplifica a resposta celular induzida pelo vírus. O gene de resistência ao ortomixovírus (MX1) atua interferindo com o tráfego intracelular e a atividade das polimerases virais, inibindo assim a replicação de muitos vírus de RNA. Outro gene importante é o IFIT-1, o primeiro gene identificado da família de genes IFIT. O IFIT-1 é uma proteína citoplasmática que não possui função enzimática. Diversos trabalhos demonstram como o IFIT-1 pode estar contribuindo para o controle viral. Já foi demonstrado que o IFIT-1 é capaz de inibir a replicação do papiloma vírus humano (HPV) através do sequestro da helicase 1 (E1). Além disso, quando o IFIT-1 é expresso no meio exógeno, ele pode inibir em 40% a tradução celular global em células HT1080, e dessa forma pode retardar a replicação do vírus (Revisto em Borden *et al.*, 2007; revisto em Fensterl *et al.*, 2015).

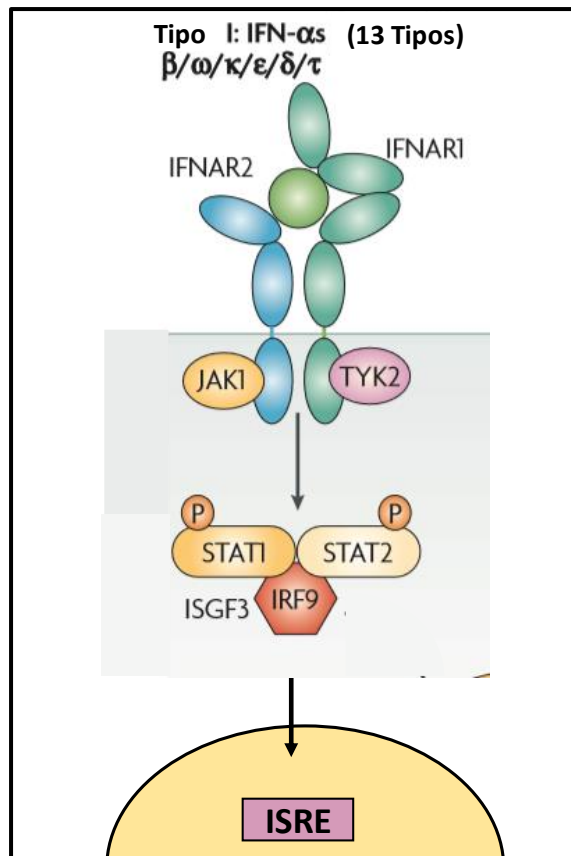


Figura 7: Representação esquemática da via de sinalização dos IFNs-I e indução de ISGs. As citocinas do grupo do IFN do tipo I ligam-se ao receptor de IFN do tipo I (IFNAR) que contém duas subunidades IFNAR1 e IFNAR2. Após a ligação ao receptor, ocorre a associação entre os receptores e proteínas quinases JAK1 e TYK2, que uma vez ativadas fosforilam STAT1 e STAT2 formando um heterodímero que se associa com o fator IRF9 formando o complexo ISGF3 que se transloca para o núcleo e induz a transcrição de ISGs (Adaptado de Borden *et al.*, 2007).

Os ISGs são diversos e, dentre essa variedade de ISGs, alguns são induzidos pelo IFN- α , outros pelo IFN- β ou até mesmo pelos IFN- α/β em conjunto. A identificação da especificidade de indução de ISGs é muito importante para possíveis estudos terapêuticos e intervenções médicas. Um trabalho com intuito de identificar que genes são induzidos por IFN- α/β esclareceu muitas dúvidas sobre esse assunto. Utilizando células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de indivíduos saudáveis, os autores trataram essas células com IFN- α 2b, IFN- β por 24 horas e realizaram um microarranjo para analisar o perfil de expressão gênica dessas células após o estímulo. Através da análise dos dados desse artigo, conseguiu-se identificar os genes estimulados especificamente por IFN- α e IFN- β , assim como aqueles estimulados por ambos (Walddell *et al.*, 2010) (Figura 9).

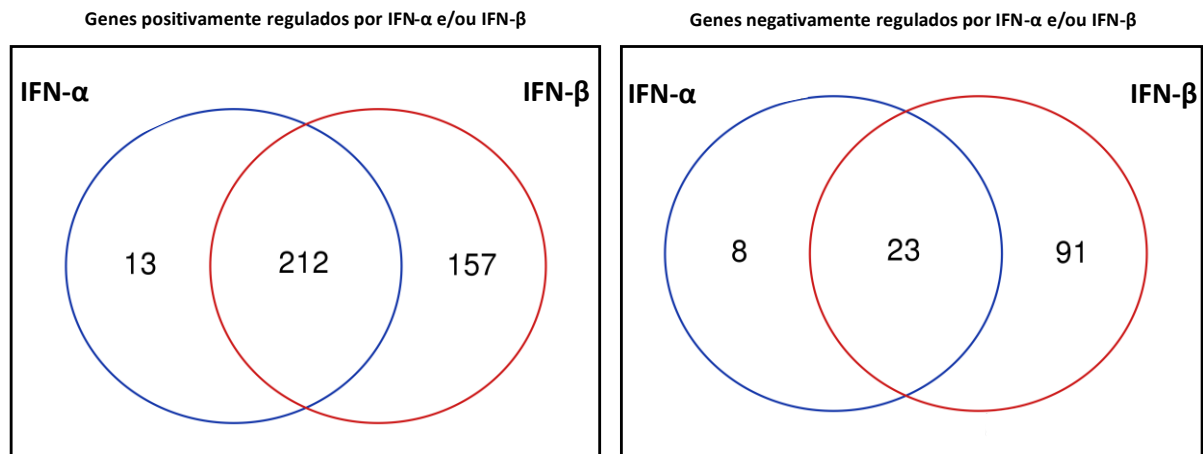


Figura 8: Diagrama de Venn apresentando a quantidade de genes regulados positivamente e negativamente por IFN- α e IFN- β . (Walldell *et al.*, 2010).

1.3.2 Papel do IFN do tipo I em diferentes contextos patológicos

O IFN do tipo I têm grande capacidade de restringir a replicação viral. Diversos estudos vêm demonstrando ao longo do tempo o potencial do IFN-I no controle viral. Em 2014, um estudo utilizando macacos rhesus infectados pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) demonstrou que o bloqueio da sinalização do receptor IFNAR leva à diminuição da expressão de genes antivirais, o aumento do tamanho do reservatório do SIV e acelera a depleção de células T CD4⁺, com progressão para AIDS. Por outro lado, a administração de IFN- α 2a recombinante aumentou inicialmente a expressão de genes antivirais e impediu a infecção sistêmica nesses animais. No entanto, sem interromper o tratamento com IFN- α 2a, os animais tornaram-se dessensibilizados para IFN- α/β , fazendo com que a expressão de genes antivirais diminuísse. Dessa forma, ocorreu o aumento do tamanho do reservatório SIV e perda acelerada de células T CD4⁺. Este estudo indica que o momento das respostas induzidas por IFN-I na infecção aguda por SIV afeta de forma marcante o curso geral da doença (Sandler *et al.*, 2014). Outro estudo bem interessante, utilizou um modelo com camundongos humanizados infectados por HIV. Nesse trabalho eles demonstraram que o bloqueio *in vivo* da sinalização de IFN-I, usando um bloqueador do receptor IFNAR2, durante a infecção crônica pelo HIV, leva à redução da expressão de ISGs. Além disso, leva a diminuição da ativação imune induzida pelo HIV, diminuição da expressão de marcadores de exaustão de células T (PD-1, TIM-3 e CD38), restauração da função das células T CD8 específicas para o HIV e

diminuição da replicação viral. Esses trabalhos destacam os papéis complexos que o IFN-I pode desempenhar durante as respostas antivirais (Zhen *et al.*, 2017).

Quando se trata de infecções bacterianas, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação do IFN-I, que pode levar a efeitos benéficos ou maléficos para o hospedeiro. A infecção por *Legionella pneumophila*, uma bactéria intracelular, induz a expressão de IFN- β em células epiteliais pulmonares humanas. E, ensaios de multiplicação bacteriana, demonstraram que o IFN- β é essencial para o controle da replicação intracelular de *L. pneumophila* (Opitz *et al.*, 2006). Outro trabalho, utilizando um modelo de camundongos deficientes para o receptor IFNAR, demonstrou que a ausência de sinalização para o IFN-I leva a maior sobrevivência dos animais e os animais controles que possuem a sinalização totalmente ativa, não sobrevivem a infecção por *Listeria monocytogenes*. Além disso, ao tratar esses animais com um potente indutor da produção do IFN-I, o agonista de TLR-3, poli I:C, e infectá-los com *L. monocytogenes*, esses camundongos não conseguem sobreviver à infecção. Esses dados indicam que a ativação de IFN-I favorece a infecção, sendo prejudicial para o hospedeiro (O'Connell *et al.*, 2004).

Diversos estudos têm demonstrado uma redução da carga bacteriana e ou um aumento na sobrevivência do hospedeiro na ausência de sinalização mediada por IFN-I durante a infecção com *M. tuberculosis*. Estudos de infecção com diferentes cepas de *M. tuberculosis* demonstraram uma correlação entre níveis aumentados de IFN-I e o aumento da virulência. O tratamento intranasal com IFN-I nos pulmões durante a infecção também foi prejudicial para o hospedeiro, resultando em aumento da carga bacilar e menor sobrevida (Manca *et al.*, 2001; Manca *et al.*, 2005). Além disso, em um estudo utilizando uma coorte de pacientes do Reino Unido e outra da África do Sul, foi observada a importância do IFN-I como um fator potencialmente prejudicial durante a tuberculose (Berry *et al.*, 2010). Os pacientes com tuberculose ativa apresentavam um acentuado perfil transcricional no sangue total induzido por IFN- α/β , que se correlacionava com a gravidade da doença radiográfica e diminuía com o tratamento bem-sucedido. Esses dados apontam para um papel prejudicial do IFN-I durante a tuberculose (Berry *et al.*, 2010).

O estudo de respostas de IFN tipo I e II revelou uma correlação inversa na expressão gênica em lesão de pele de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase. Pacientes paucibacilares expressam IFN- γ e seus genes antimicrobianos, impedindo a disseminação do *M. leprae*. Por outro lado, o IFN- β e

seus ISGs, incluindo a IL-10, tem sua indução aumentada em pacientes multibacilares. O mesmo estudo mostrou que IFN- β e IL-10 inibem a via de produção de peptídeos anti-microbianos mediada por vitamina D e induzida por IFN- γ , indicando que estes mediadores podem favorecer o crescimento e a disseminação do bacilo nos pacientes multibacilares (Teles *et al.*, 2013). Recentemente, um estudo identificou o gene *OASL*, que é induzido por IFN-I, sendo regulado positivamente tanto em células humanas de Schwann quanto em macrófagos THP-1 após infecção *in vitro* por *M. leprae*. Posterior a isso, eles foram avaliar o papel do gene *OASL* durante a infecção pelo *M. leprae*. Para isso, eles utilizaram macrófagos THP1 *Knock Down* para o gene *OASL* e identificaram que o silenciamento do *OASL* levou a diminuição da viabilidade intracelular do *M. leprae*. Esses dados sugerem um papel importante do IFN-I em favorecer a sobrevivência do patógeno (Toledo-Pinto *et al.*, 2016).

Os IFNs tipo I, principalmente o IFN- α , desempenham um papel crítico na patogênese de doenças inflamatórias crônicas que são interrompidas por episódios inflamatórios agudos, como o lúpus eritematoso sistêmico (LES). Diversos trabalhos demonstram um aumento da assinatura de IFN- α no sangue e na pele, que está diretamente associado com o aumento dos níveis detectáveis de auto-anticorpos e a atividade de doença. As pDCs são consideradas as maiores produtoras de IFN-I através da ativação de TLR-7 e 9 no lúpus. Já foi demonstrado que pacientes com lúpus tratados com altas doses de corticosteroide apresentam um número decrescente de pDC circulante acompanhado por rápida diminuição da assinatura de IFN-I (Bennett *et al.*, 2003; revisto em Guidducci *et al.*, 2008; Wahadat *et al.*, 2014). Um estudo utilizando um escore de IFN-I foi recentemente realizado para tentar prever o desenvolvimento de lúpus em indivíduos em risco. Foi comprovado que a atividade do IFN-I está fortemente associada à progressão da doença independente do estado clínico inicial (Yosof *et al.*, 2018).

Uma série de estudos vêm demonstrando o papel patogênico do IFN- α no LES, que acreditamos que possa ser aplicado ao eritema nodoso hanseniano. Um resumo dos efeitos do IFN- α que levam a uma desregulação da resposta imune inata e adquirida e amplificação da inflamação está representado na Figura 10. A NETose é sabidamente estimulada por IFN- α , que por sua vez promove a sobrevivência, ativação e diferenciação de células B autorreativas em plasmócitos produtores de autoanticorpos. Estes anticorpos formam imunocomplexos com o DNA e proteínas das NETs, que por sua vez ativam a pDC a produzir mais IFN- α . Através de um

feedback positivo, o IFN- α ativa os neutrófilos a responder aos complexos imunes, sofrendo NETose e liberando mais auto-antígenos que a célula dendrítica pode absorver e processar. O IFN- α também estimula e mantém a diferenciação de monócitos do sangue em células apresentadoras de antígeno totalmente ativadas e capazes de apresentar auto-antígenos a células T autorreativas que escaparam da tolerância central. Dessa forma ocorre uma retro-alimentação e consequente amplificação do processo inflamatório (Revisto em Guiducci *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2015; Barrat & Su, 2019).

Baseado nos dados mencionados, nossa hipótese é que ligantes de TLR-9 endógenos e de origem micobacteriana ativem a produção de IFN-I durante o ENH provocando uma ativação e desregulação da resposta imune inata e adquirida desencadeando a síndrome inflamatória observada nestes episódios reacionais.

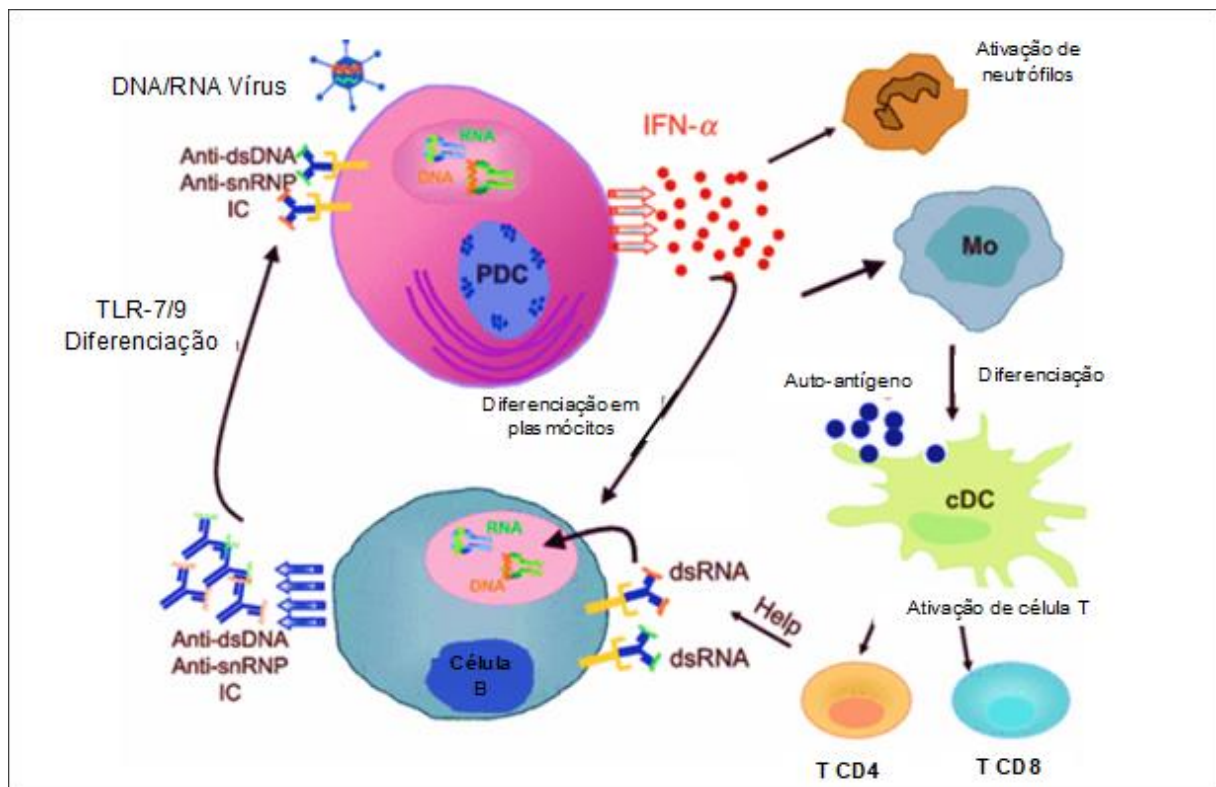


Figura 9: Hipótese do papel do IFN- α na patogênese do lúpus eritematoso sistêmico. Complexos imunes contendo DNA/RNA podem ativar células dendríticas plasmocitoides (pDC) e induzir a síntese de IFN- α , que pode aumentar a produção de auto-anticorpos por células B específicas para DNA de cadeia dupla (dsDNA), estimulando a diferenciação de células B *naïve* em plasmócitos. O IFN- α estimula a diferenciação de monócitos sanguíneos em células apresentadoras de antígeno capazes de apresentar auto-antígenos a células T CD8 e CD4 auto-reativas. Além disso, o IFN- α leva à ativação de neutrófilos que podem responder ao complexo imune. A morte de neutrófilos pode constituir uma

fonte adicional de auto-antígenos que o cDC pode captar e processar. (Adaptado de Guiducci *et al.*, 2008; Barrat and Su, 2019).

1.4 Justificativa

O eritema nodoso hanseniano (ENH) é uma complicação imunológica grave das formas LL e BL da hanseníase e é considerado uma das principais causas de lesão nos nervos periféricos e das incapacidades físicas que podem ocorrer nos indivíduos portadores desta doença. A maioria dos pacientes pode ser acometido por múltiplos episódios e, o fármaco de escolha para o seu tratamento é a talidomida, que tem uso restrito devido aos seus efeitos teratogênicos. Dessa forma, a identificação de biomarcadores que possibilitem um diagnóstico precoce dessas reações, assim como um tratamento alternativo à talidomida, são extremamente necessários para minimizar a ocorrência e consequências desses episódios.

Para tal, é imprescindível um melhor entendimento da patogênese do ENH, identificando tanto os mecanismos que disparam o episódio reacional assim como os que amplificam e promovem a manutenção do processo inflamatório. O ENH é um fenômeno inflamatório complexo, onde tanto vias da imunidade inata como adquirida se encontram desreguladas e ativadas. Recentemente nosso grupo observou que o reconhecimento de DNA pelo receptor TLR9 constitui uma via inflamatória inata importante durante o ENH (Dias *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2019). Por outro lado, sabe-se da literatura que a ativação da via de TLR-9 pode ter como consequência importante a produção de IFN-I, uma família de citocinas com papel crítico na patogênese de diversas doenças autoimunes crônicas inflamatórias, como o LES (Guiducci *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2015; Barrat and Su, 2019).

Dessa forma, o presente estudo buscou um melhor entendimento sobre o papel do IFN-I no ENH, contribuindo para uma melhor compreensão da sua imunopatogênese, podendo colaborar com a busca por novos alvos terapêuticos e biomarcadores.

2. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o envolvimento de IFN-I na patogênese do ENH.

1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar genes de assinatura de IFN-I em células de lesões de pele e sangue de pacientes hansênicos multibacilares com e sem ENH.
- Analisar a presença de IFN- α em células de lesões de pele de pacientes hansênicos multibacilares com e sem ENH.
- Investigar se o tratamento com talidomida em pacientes ENH modula os níveis de IFN-I e a expressão genes de assinatura associados sistemicamente e células nas lesões de pele.
- Quantificar IFN-I em soro de pacientes multibacilares com e sem ENH.
- Analisar o efeito de IFN- α no processo de NETose em neutrófilos estimulados ou não com sonicado de *M. leprae*.
- Quantificar a secreção de IFN-I por células mononucleares do sangue periférico de pacientes hansênicos multibacilares sem e com ENH (antes e após tratamento com talidomida) estimulados ou não com ligante de TLR-9.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1- População de estudo

A população de estudo consistiu de controles sadios de voluntários endêmicos do laboratório e de pacientes com hanseníase atendidos no Ambulatório Souza Araújo (ASA), (conforme a tabela 2), unidade de referência para diagnóstico e tratamento de hanseníase do Ministério da Saúde (Laboratório de Hanseníase, IOC/Fiocruz). Cada paciente foi avaliado clinicamente durante todo o tratamento e análises detalhadas de exames médicos e dermatológicos foram realizados rotineiramente. Os pacientes foram categorizados de acordo com a escala de classificação de Ridley e Jopling e receberam a poliquimioterapia conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde. Foram selecionados para este estudo: 1) Pacientes com hanseníase lepromatosa (LL) ou Borderline lepromatosa (BL) sem sinais de reação no diagnóstico de hanseníase antes da PQT (grupo LL/BL); 2) Pacientes recém-diagnosticados com ENH antes do tratamento com talidomida (ENH D0); e 3) Pacientes ENH após 7 dias do início do tratamento com talidomida (ENH D7). As amostras biológicas (sangue e pele) foram coletadas por profissionais capacitados no ASA e transportadas ao laboratório em caixa isotérmica. Os dados demográficos e clínicos dos voluntários que participaram deste estudo estão resumidos na Tabela 2.

Grupo	Amostra	Ensaio	Indivíduos	Sexo (Fem-Mas)	Idade (Média)	Idade (Min-max)	ILB (Média)
Sadios (n 6)	Sobrenadante de neutrófilos	Dosagem de DNA/NETs	6	4-2	33	27-35	N. A.
LL/BL (n 45)	Pele	RT-q PCR	14	0-14	44	19-70	5.2
		Western blot	9	1-8	44	21-70	5.6
		Imunofluorescência	3	0-3	40	21-70	5.85
	Sangue total	RT-q PCR	12	2-10	54	22-83	3.9
	Sobrenadante de PBMC	Dosagem de IFN-I	3	0-3	56	47-62	-
	Soro	Dosagem de IFN-I	13	3-10	51	31-68	3.4
ENH D0 (n 36)	Pele	RT-q PCR	19	2-17	44	21-70	3.3
		Western blot	6	1-5	37	21-70	4
		Imunofluorescência	3	0-3	39	34-43	4.4
	Sangue total	RT-q PCR	13	1-11	46	22-76	3.8
	Sobrenadante de PBMC	Dosagem de IFN-I	2	1-1	34	23-46	-
	Soro	Dosagem de IFN-I	13	5-7	53	29-76	5
ENH D7 (n 21)	Pele	RT-q PCR	11	1-10	36	21-68	2.8
		Western blot	3	0-3	30	21-48	3.65
		Imunofluorescência	3	1-2	41	34-50	4.3
	Sangue total	RT-q PCR	9	0-9	32	22-52	3.5
	Soro	Dosagem de IFN-I	13	4-9	42	18-70	3.85

Tabela 2: Dados demográficos e clínicos dos pacientes e doadores sadios incluídos no estudo.

BL, forma *borderline*-lepromatosa; LL, forma polar lepromatosa; ENH D0, eritema nodoso hanseniano no diagnóstico; ENH D7, eritema nodoso hanseniano 7 dias após o início do tratamento com talidomida; ILB, índice logarítmico da biópsia. N. A.= não se aplica.

3.2- Considerações Éticas

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (CEP IOC/FIOCRUZ) (CAAE 56113716.5.0000.5248). O termo de consentimento foi assinado por todos os pacientes ou seus responsáveis e controles sadios antes da coleta da amostra.

3.3- Extração de RNA total

As amostras de lesões cutâneas biopsiadas foram processadas utilizando 2 mL de reagente TRIzol® (Life technologies, USA), com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (POLYTRON® PT-3100D - Kinematica AG). Em seguida, as amostras em TRIzol® foram transferidas para microtubos e o RNA extraído segundo as instruções do fabricante. Para isso, adicionou-se 200 µL de clorofórmio (Merck, Alemanha) em cada tubo de 1,5 mL, livre de DNase/RNase, para cada 1 mL de TRIzol® e os mesmos foram homogeneizados por inversão até se obter um aspecto leitoso. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12000 *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), os mesmos foram misturados por inversão e incubados a -70° C por no mínimo 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 sedimento e então centrifugados a 12000 *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 7500 *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) que foram estocadas a -70°C para análises posteriores.

Para extração do RNA proveniente do sangue total estocado em tubos Paxgenes (BD Biosciences) a -70°C por período inferior a seis meses procedeu-se com descongelamento dos tubos durante 2 horas, seguido pela centrifugação dos tubos a 3000 *xg* por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foi adicionado 5 mL de água deionizada livre de RNAase e foi realizado a homogeneização em vortex por 1 minuto. Em seguida o pellet foi ressuspensão em 350 µL de tampão BR1, homogeneizado em vortex e a amostra foi transferida para tubos poliuretano (Eppendorf, EUA) com 300 µL de tampão BR2 e 40 µL de proteinase K. As amostras foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 10 minutos a 55°C em banho seco. Em seguida, as amostras foram colocadas por 10 minutos na velocidade máxima na microcentrifuga. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de poliuretano e foi adicionado 350 µL de etanol 100%. O lisado foi transferido para a

coluna inserida no tubo coletor e levado a centrifugação por 8000 *xg* por 60 segundos em microcentrifuga. Em outro tubo, a 2ª coluna foi inserida e o lisado foi ajustado para 750 μL . Após nova etapa de centrifugação a 1800 *xg* por 30 segundos, foi adicionado ao sedimento 350 μL do tampão de dissociação e nova centrifugação foi feita a 8000 *xg* por 60 segundos. O tampão de DNAase MIX, foi feito imediatamente antes do uso com 70 μL de tampão de rDNAse e 10 μL de rDNAse, ambos homogeneizados com pipeta de forma suave. O MIX (80 μL) foi colocado em uma membrana, sendo esta incubada a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 200 μL de tampão de inativação de rDNAse e nova etapa de centrifugação foi realizada a 8000 *xg* por 30 segundos. Esta operação foi repetida 3 vezes. A partir de então, a membrana seca foi transferida para um tubo e 1,5 mL livre de nucleases. O RNA foi eluído com 80 μL de água deionizada livre de RNAse e o tubo coletor foi centrifugado a 8000 *xg* por 60 segundos.

3.4- Quantificação e análise da integridade do RNA

Posteriormente, a concentração e a qualidade do RNA foram medidas através do espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo scientific, USA). Apenas amostras de alta qualidade (razões 260/280 de 1,9 a 2,1) foram usadas para a análise. A integridade das amostras de RNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose (Life technologies, USA) 1,2 % em tampão MOPS 1 X (Sigma-Aldrich, USA). Inicialmente foram adicionadas 200 ng da amostra de RNA, 7 μL de tampão de corrida e 1 μL de SYBR® Green II 100 X (Life technologies, USA) e depois as amostras foram aplicadas no gel. A corrida de eletroforese foi realizada em corrente elétrica de 100 V por 50 minutos. Após esse período, o gel foi analisado por sistema de fotodocumentação (L-Pix touch, Loccus biotecnologia, SP). O RNA foi considerado íntegro quando observados os RNAs das subunidades ribossomais esperados (28S e 18S) e ausência de rastros de RNA no gel.

3.5- Tratamento com DNase e Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir de 1µg de RNA total adicionado à reação de síntese de cDNA, com o uso do kit SuperScript III® First-Strand Synthesis SuperMix para RT-PCR em tempo real (Life Technologies, USA). Seguindo o protocolo do fabricante, 1µg de RNA acrescido de 1 µL de Oligo(dT)20 (50 µM), 1 µL de Anneling Buffer e H₂O em quantidade suficiente para completar 8 µL de volume final, foram incubados a 65° C por 5 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram mantidas em gelo, por pelo menos 1 minuto.

Em um segundo momento, foram adicionados 10 µL de 2 X First-Strand Reaction Mix e 2 µL de SuperScript® III/RNaseOUT™ Enzyme. Essa mistura foi incubada a 50° C por 50 minutos para transcrição, seguida de incubação a 85° C por 5 minutos para inativação da enzima. Após o período de incubação, as amostras foram mantidas em gelo, por pelo menos 1 minuto e posteriormente armazenadas a -20° C até posterior uso.

3.6- RT-qPCR em tempo real para análise da expressão gênica

As reações em cadeia da polimerase em tempo real (PCR quantitativo - qPCR) foram realizadas utilizando-se o sistema SYBR Green I (Applied Biosystems), com os pares de iniciadores específicos para as sequências codificantes dos genes *EIF2AK2*, *MX1*, *IFIT1* e *RPL13* humanos. De acordo com as recomendações do fabricante, foi realizada uma reação de 10 µL, onde foram adicionados 1 µL de cDNA, 0,2 µL de cada oligonucleotídeo e SYBR Green PCR Master Mix 1X. As reações foram incubadas no sistema de qPCR ViiA-7® (Applied Biosystems). Condições da reação: 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Em cada amostra foi amplificado o cDNA dos genes de interesse (*EIF2AK2*, *MX1*, *IFIT1*) e o gene constitutivo utilizado como normalizador (*RPL13*). A análise da expressão gênica foi realizada utilizando-se o método delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$).

3.7- Imunofluorescência

A imunofluorescência foi realizada a partir de fragmentos de biópsias de lesão de pele de pacientes LL e ENH estocadas em nitrogênio líquido. Para realizar a marcação, seções do tecido congelado foram obtidas após corte em criostato, seguida de fixação em acetona e incubação com soro de cabra normal a 10%. As seções foram incubadas *overnight* com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-IFN- α , clone-MMHA-2 (pbl assay Science) (1: 100), seguida de incubação com o anticorpo secundário anti-camundongo de cabra conjugado com fluorocromo alexa fluor 594 (Invitrogen) (1: 500). Os núcleos foram evidenciados através de coloração com DAPI. As lâminas foram montadas com Antifade (Invitrogen) e analisadas em microscópio AxiObserver Z1 Colibri (Zeiss). As imagens foram processadas pelo software AxioVision (Zeiss) e adquiridas no mesmo tempo de exposição.

3.8- Extração e quantificação de proteínas de biópsias de pele

As lesões de pele obtidas de biópsia foram processadas para extração de proteínas de acordo com o protocolo de 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 dialisada contra 0,1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) a 4°C por 22 horas, com três trocas de solução, uma a 16 horas, a segunda a 20 horas, permanecendo mais 2 horas sob agitação. As amostras foram então centrifugadas a 6.000 xg por 10 minutos a 4°C e, em seguida, o pellet foi ressuspenso e homogeneizado em 20 μ L 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), segundo instruções do fabricante.

3.9- Western Blotting

O volume equivalente a 20 µg de proteína de cada 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 então fervidas por 5 minutos e aplicadas em um gel de poliacrilamida 12%. Aplicou-se também o padrão de peso molecular pré corado PageRuler (Thermo Fisher Scientific). A corrida eletroforética 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 eficiência da transferência, para dar então prosseguimento ao *western blotting*.

A membrana foi bloqueada por 2 horas em em TBS-T (Tris buffered saline-tween, composto por Tris-HCl 20mM pH 8,0; NaCl 150 µM e 0,1 % Tween 20) contendo 5% de BSA (albumina do soro bovino). A membrana foi incubada *overnight* com um anticorpo policlonal de coelho anti-MX1 (proteintech®), em uma diluição de 1:1000 (preparado em TBS-T contendo 1% de BSA). Passada a incubação, a membrana foi lavada com TBS-T durante 10 minutos em agitação moderada, repetindo o processo mais 2 vezes, trocando a solução. Após essa etapa, a membrana foi incubada com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a enzima peroxidase (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:5.000 por 1 hora. Ao término da incubação, foram realizadas mais 3 lavagens, conforme já descrito. A membrana foi posicionada no cassete de revelação para dar prosseguimento à 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 em 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).

3.10- Quantificação de interferon do tipo I pelo kit QUANTI-Blue

A linhagem de células HEK-293 foi adquirida da InvivoGen. As células foram mantidas em meio de crescimento Dulbecco Eagle modificado (DMEM) high glucose e glutamina, suplementado com 10% soro fetal bovino e com os antibióticos seletivos blastomicina e zeocina, e incubadas a 37°C/5% CO₂. Para a quantificação de IFN-I, as células foram obtidas utilizando tripsina e o sobrenadante foi centrifugado a 900 xg por 5 minutos. Após as células foram contadas em câmara de Neubauer utilizando exclusão por azul de tripan. Então, foram semeadas ~50.000 células por poço em placas de 96 poços em 180 µL de meio. Posteriormente, aos poços foram adicionados 20 µL da amostra (soro ou sobrenadante de cultura de PBMC), seguida de incubação por 20-24 horas a 37°C/5% CO₂. Uma curva padrão foi construída com concentrações crescentes de IFN-α 2b (Biosintética) de 9.5 a 156 U/mL. Também foi incluído um controle negativo (IFN-γ). Para a quantificação de IFN-I, 20 µL dos sobrenadantes das culturas de HEK-293 foram transferidos para placa de 96 poços e então foi adicionado 180 µL de QUANT-Blue por poço longe da luz, e incubados em estufa a 37°C de 15 minutos a 1 hora. O QUANT-Blue foi preparado conforme instruções do fabricante. A placa foi lida em um espectrofotômetro (Spectra Max 190/Molecular Devices) com a densidade ótica de 620-655 nm.

3.11- Purificação de PBMC e neutrófilos de sangue total por Ficoll

A manipulação do material biológico foi realizada em cabine de segurança biológica, nível NB2 em ambiente estéril. O sangue periférico foi coletado em tubos de heparina e diluído na proporção 1:1 em tampão salina fosfato (PBS) 1X. Para separação das células por gradiente de densidade, Ficoll Hypaque foi adicionado em novos tubos de 50 mL (GE Healthcare, Suécia) e obedecendo a proporção 1:1 foi adicionado o sangue total diluído lentamente de modo que não se misturasse ao Ficoll. Posterior a isso, os tubos foram centrifugados a 900 xg, por 30 minutos a 25°C. Após a centrifugação ocorreu a separação dos componentes, e subsequente coleta da fração de células mononucleares. Estas células foram transferidas para tubos novos, diluídas em PBS 1X e centrifugados a 500 xg, por 10 minutos a 4°C. Essa lavagem foi repetida até que o *pellet* ficasse limpo. As células foram ressuspensas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), L-glutamina a 2 mM,

penicilina a 100 U/mL e estreptomicina a 100 mg/mL (meio completo) e contadas em câmara de Neubauer utilizando exclusão por azul de Tripán (Bio WHITTAKER, EUA).

Para a purificação de neutrófilos, após retirar a fração de células mononucleares, foi retirado o conteúdo de Ficoll e plasma que sobrou e descartado, ficando apenas a fração de células polimorfonucleares e hemácias localizadas no fundo do tubo. Esta fração foi transferida para novos tubos de 50 mL e completou-se o volume até 45 mL com solução de lise de eritrócitos ACK (1,7 M de NH₄Cl, 0,1M de KHCO₃ e mM EDTA). Os tubos foram homogeneizados por aproximadamente 10 minutos, e centrifugados a 900 *xg* por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado e foi adicionado ACK ao pellet homogeneizando por 5 minutos e centrifugados a 900 *xg* por 10 minutos a 4°C. Por fim, o sobrenadante foi descartado, e ao pellet limpo foi adicionado PBS 1X e centrifugados a 900 *xg* por 10 minutos a 4°C. O pellet foi ressuspensão em meio RPMI completo, e as células contadas em câmara de Neubauer utilizando exclusão por azul de Tripán.

3.12- Cultura de PBMC

As PBMCs foram plaqueadas em 1000 µL de meio RPMI 1640 (completo) em placa de 24 poços (1x10⁶ células por poço), para experimento de quantificação de IFN- γ . As células foram estimuladas ou não com *M. leprae* sonificado 20 µg/mL (NR-19329; Bei Resources), com complexo oligonucleotídeo CpG-Hlp (0.5 e 0.25 µM, respectivamente) e R848 1µg (agonista de TLR7) por 24 horas em estufa à 37°C e 5% CO₂. Após o tempo de incubação dos estímulos os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 500 *xg* por 5 minutos, os sobrenadantes foram coletados, e congelados para dosagem de IFN- γ . O oligonucleotídeo CpG foi adquirido comercialmente (CpG classe A – ODN 2395; Invitrogen). Já a Hlp recombinante foi obtida no nosso laboratório e complexada ao CpG conforme previamente descrito (Dias *et al.*, 2016).

3.13- Culturas de neutrófilos

Os neutrófilos isolados de sangue periférico foram plaqueados em 200 µL de meio RPMI 1640 em microtubos de centrifugação (Eppendorf) de 0,5 mL (1×10^6 células por tubo) para os experimentos de quantificação de NET. As células foram pré estimuladas ou não com IFN- α 1000 U/mL por 3 horas em estufa à 37°C e 5% CO₂. Após esse tempo as células foram estimuladas ou não com *M. leprae* sonicado 20 µg/mL por 90 minutos em estufa à 37°C e 5% CO₂. Após o tempo de incubação dos estímulos os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 500 *xg* por 5 minutos, para retirar *debris* celulares, e congelados para dosagem de DNA.

3.14- Quantificação de DNA

A liberação das NETs foi avaliada pela dosagem de DNA nos sobrenadantes das culturas de neutrófilos (25 µL), estimulados com IFN- α , *M. leprae* sonicado e IFN- α + *M. leprae* sonicado, além do controle não estimulado, e incubados com 50 µL de PicoGreen e 25 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) por 2 a 5 minutos à temperatura ambiente, protegido da luz. A leitura foi realizada por fluorescência e detectada em um leitor de microplacas SpectraMax Paradigm® na faixa de 485 de emissão e 538 nm de excitação (Molecular Devices). O DNA foi quantificado com Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay *kit* (Thermo Fisher Scientific).

3.15- Análise estatística

Todas as análises e gráficos foram feitas utilizando GraphPad Prism versão 6.0. Os resultados estão apresentados como mediana. Para avaliar a significância estatística, primeiro foi realizado os testes de normalidade D'Agostino & Pearson omnibus, Shapiro-Wilk e KS. Após, foi realizado o test t de Student não paramétrico e o One-way ANOVA, onde o nível de significância considerado foi $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1- Caracterização dos pacientes ENH incluídos no estudo

O estudo compreendeu um total de 23 pacientes ENH, sendo 86,3% da população de estudo do sexo masculino e 13,7% do sexo feminino, com idade entre 21 e 76 anos. Os pacientes multibacilares (BL/LL) recrutados apresentaram ENH antes, durante ou após o tratamento com a PQT. Desses pacientes 13,6% apresentaram o episódio reacional antes da PQT, 27,2% durante a PQT e 59,2% após a PQT. A maioria dos pacientes ENH incluídos no estudo apresentaram a forma clínica LL (86,3%) (Tabela 3).

A classificação clínica de ENH leve, moderado e grave foi determinada de acordo com a sintomatologia clínica do paciente. Através das avaliações clínicas realizadas foi gerado um escore, que utiliza os seguintes parâmetros de análise: febre, número e extensão de lesões cutâneas, edema periférico e sinais sistêmicos (mal estar, cefaleia, queixas nasais e visuais, mialgia, dor testicular, dor óssea, dor neural, alteração de sensibilidade, cianose, fraqueza muscular, perda de peso, artralgia, parestesia e adnomegalia) (Schmitz *et al.*, 2016). Ficha em anexo.

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

Paciente	Sexo	Idade	Forma clínica	IB	Ocorrência do episódio reacional	Gravidade
ENH 1	M	70	LL	5.57	Antes da PQT	Moderado
ENH 2	M	55	LL	2	Após a PQT	Grave
ENH 3	M	21	LL	5	Durante a PQT	Grave
ENH 4	M	42	LL	4	Antes da PQT	Moderado
ENH 5	F	68	LL	0.75	Após a PQT	Grave
ENH 6	M	21	LL	2.5	Após a PQT	Moderado
ENH 7	M	27	LL	3.25	Após a PQT	Grave
ENH 8	M	31	LL	4.75	Durante a PQT	Moderado
ENH 9	M	23	LL	2.5	Após a PQT	Grave
ENH 10	M	34	LL	5.5	Durante a PQT	Grave
ENH 11	M	40	LL	2.75	Após a PQT	Grave
ENH 12	M	62	BL	2.6	Após a PQT	Grave
ENH 13	M	48	LL	4.5	Após a PQT	Grave
ENH 14	F	69	LL	3.5	Após a PQT	Moderado
ENH 15	M	27	LL	0	Antes da PQT	Grave
ENH 16	M	64	LL	4.5	Durante a PQT	Grave
ENH 17	M	31	BL	1.25	Após a PQT	Grave
ENH 18	M	61	LL	4	Durante a PQT	Grave
ENH 19	M	44	LL	5	Após a PQT	Grave
ENH 20	F	76	BL	2.5	Após a PQT	Leve
ENH 21	M	38	LL	0.25	Após a PQT	Moderado
ENH 22	M	52	LL	5.25	Durante a PQT	Leve
ENH 23	M	43	LL	3.75	Após a PQT	X

BL, forma borderline-lepromatosa; LL, forma polar lepromatosa; ENH, eritema nodoso hanseniense no diagnóstico; IB, índice bacilosscópico.

4.2- Análise da transcrição de genes induzidos por IFN do tipo I em lesão de pele de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7

Para avaliar a atividade do IFN tipo I, escolhemos 3 genes induzidos por IFN-I e realizamos o ensaio de RT-qPCR para quantificar a expressão de mRNA relativa em lesões de pele de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7. Na figura 10A avaliamos a expressão do gene *EIF2AK2* no grupo LL/BL vs ENH D0 e observamos expressão significativamente maior nos pacientes ENH D0, com um valor da mediana para este grupo de 6 vezes em relação ao grupo LL/BL. Vale a pena ressaltar que todos os pacientes LL/BL apresentaram algum tipo de reação durante o acompanhamento dos mesmos. Os que apresentaram ENH estão indicados em verde e os em laranja sofreram RR. Dois destes pacientes apresentaram níveis de mRNA acima do valor da mediana do grupo ENH. Não observamos correlação positiva entre a expressão gênica e os seguintes parâmetros: IB (nos grupos LL/BL e ENH); intervalo de tempo do aparecimento do quadro reacional a partir do diagnóstico de hanseníase nos pacientes LL/BL que desenvolveram reação durante o acompanhamento; a gravidade da reação (paciente ENH). Também avaliamos se o tratamento com a talidomida poderia modular a expressão de genes induzidos por IFN do tipo I. Para isso realizamos o acompanhamento longitudinal dos pacientes no momento do diagnóstico do ENH (ENH D0) e 7 dias após o início do tratamento com a talidomida (ENH D7). Na figura 10B, podemos observar que dos 6 pacientes analisados, 4 tiveram uma redução da expressão do gene *EIF2AK2* e dois pacientes apresentaram aumento.

Nas figuras 10C e 10D avaliamos a transcrição do gene *MX1*. Na figura 10C, observamos um padrão muito semelhante ao detectado para o gene *EIF2AK2*, com um valor da mediana 5 vezes maior para o grupo ENH em relação ao grupo LL/BL, ainda que não estatisticamente significativo. Neste caso, 4 dos 13 pacientes LL/BL apresentaram valores de mRNA para o gene *MX1* acima do valor da mediana do grupo ENH. Também neste caso não observamos correlação positiva entre a expressão do mRNA e os seguintes parâmetros: IB (nos grupos LL/BL e ENH); intervalo de tempo do aparecimento do quadro reacional a partir do diagnóstico de hanseníase nos pacientes LL/BL que desenvolveram reação durante o acompanhamento e, a gravidade da reação (paciente ENH). A figura 10D mostra que a expressão de *MX1* foi significativamente menor após o tratamento com a talidomida, com valor de mediana igual a 0,04191 para ENH D0 e 0,01409 para ENH D7. Já no que se refere a análise do gene *IFIT1*, o número de pacientes analisados foi muito baixo, pois não se observou amplificação em algumas reações para esse gene. Os 2 pacientes ENH que mostraram expressão mais elevada de mRNA do gene *IFIT1* também apresentaram expressão diferenciada para os outros dois genes avaliados (figura 10E). Na figura 10F, os 4 pacientes acompanhados durante o tratamento com talidomida apresentaram comportamentos variáveis.

Figura 10: Análise da transcrição relativa dos genes induzidos por IFN do tipo I em lesões de pele de pacientes com eritema nodoso hanseniano (ENH). Os valores das amostras foram normalizados utilizando o controle endógeno *RPL13*. Cada ponto representa 1 paciente, e a cor verde indica os pacientes multibacilares que evoluíram para o ENH, a cor laranja os que evoluíram para reação reversa. A- Análise do gene *EIF2AK2* em pacientes multibacilares (LL/BL=13) e pacientes reacionais (ENH =17), e B- análise do mesmo gene em pacientes acompanhados longitudinalmente no dia zero (ENH D0) e dia sete (ENH D7) (n=6) durante o tratamento com talidomida. C- Análise do gene *MX1* (BL/LL=13, ENH=17) e D- análise do mesmo gene em pacientes acompanhados longitudinalmente ENH D0 e ENH D7 (n=7). E- Análise do gene *IFIT1* (LL/BL=3, ENH =8), e F- análise do mesmo gene em pacientes acompanhados longitudinalmente ENH D0 e ENH D7 (n=4). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o test t de Student, seguido do Mann Whitney (não pareado) e o teste t de Student, seguido do Wilcoxon test (pareado) (P <0.05).

4.3- Análise da expressão de MX1 em lesões de pele de pacientes LL/BL, ENH e ENH D7

Para complementar a análise de transcrição, avaliamos a expressão proteínica MX1 em lesões de pele de pacientes hansenianos dos 3 grupos estudados por *western blotting*. Para isso, foram preparados extratos proteicos provenientes de biópsias de pele de 3 pacientes com a forma clínica LL acompanhados longitudinalmente e obtidas em 3 momentos distintos, a saber: no diagnóstico de hanseníase (lesão inicial), no momento do diagnóstico do ENH (lesão nova que surge durante a reação) e 7 dias após o tratamento com a talidomida (lesão reacional após tratamento). Quantidades equivalentes de proteína dos extratos foram aplicados e fracionadas em gel SDS-PAGE 12%, e posteriormente transferidas para membrana de nitrocelulose. A análise de *western blotting* revelou que a proteína MX1 está expressa nas células de lesão de pele dos pacientes LL e ENH, mas que o tratamento com talidomida (ENH D7) reduz consideravelmente a sua expressão (Figuras 11 A-B). A análise da média indicou que a expressão de MX1 reduziu cerca de 2 vezes após 7 dias do tratamento com talidomida.

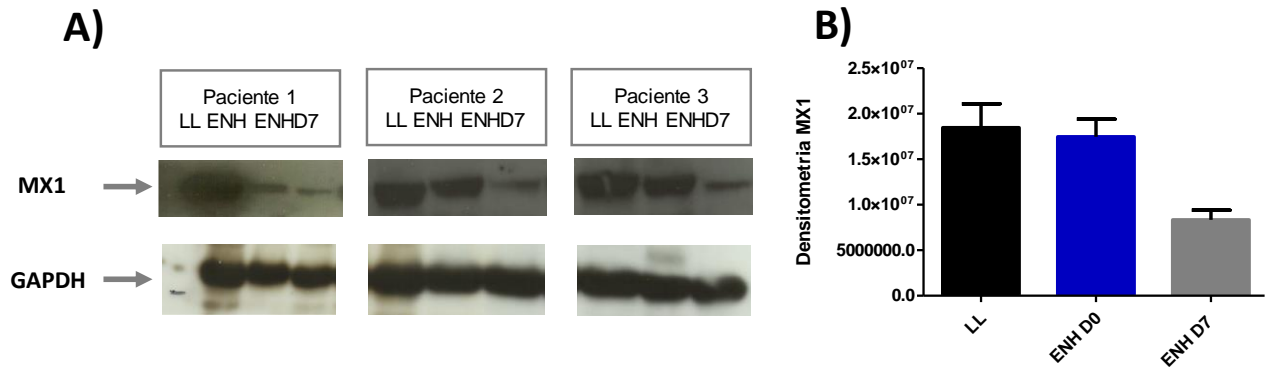


Figura 11: Análise dos níveis da proteína MX1 em lesões pele durante o eritema nodoso hanseniano (ENH). Biópsias de lesões de pele de pacientes com a forma polar lepromatosa acompanhados nos 3 momentos estudados: no diagnóstico da hanseníase (LL), no diagnóstico do eritema nodoso hanseniano (ENH D0) e 7 dias após o início de do tratamento com talidomida (ENH D7). As amostras foram extraídas com Trizol e as proteínas foram recuperadas através de diálise em 0,1% de SDS. A- Análise da expressão da proteína MX1, utilizando o anticorpo policlonal de coelho anti-MX1. A expressão de GAPDH foi considerada para controle de carregamento no gel. B- Análise por densitometria das membranas mostradas em A. Os valores das amostras foram normalizados utilizando o controle endógeno GAPDH.

Após a análise da expressão de MX1 nos pacientes multibacilares que desenvolveram o ENH, nos perguntamos se pacientes LL que até o momento não desenvolveram o ENH poderiam apresentar expressão diferenciada de MX1. Para isso, realizamos uma nova análise por *western blotting*, utilizando 3 amostras de pacientes com a forma clínica LL sem reação de 2017 até o presente momento (LL NR), e 3 pacientes com a forma clínica LL antes e durante o ENH. Nossas análises revelaram que não há diferença na expressão de MX1 nos pacientes LL sem reação, quando comparados com os pacientes LL que desenvolveram o ENH (Figuras 12A-B).

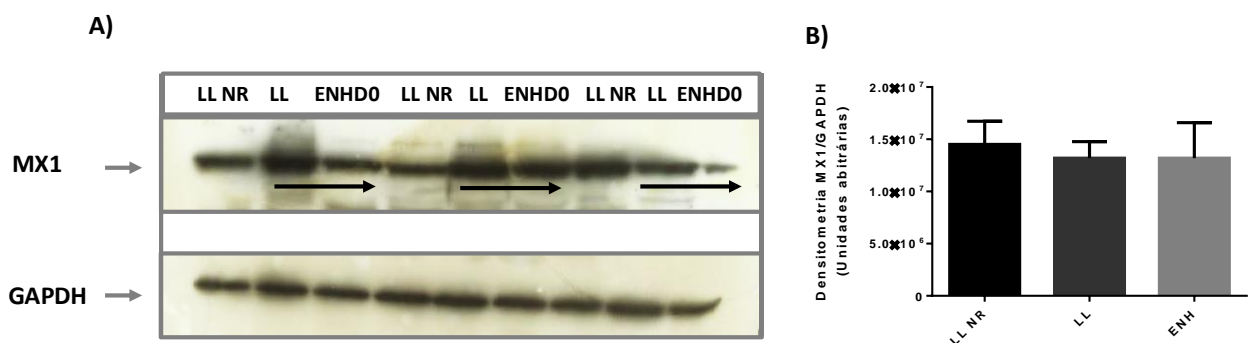


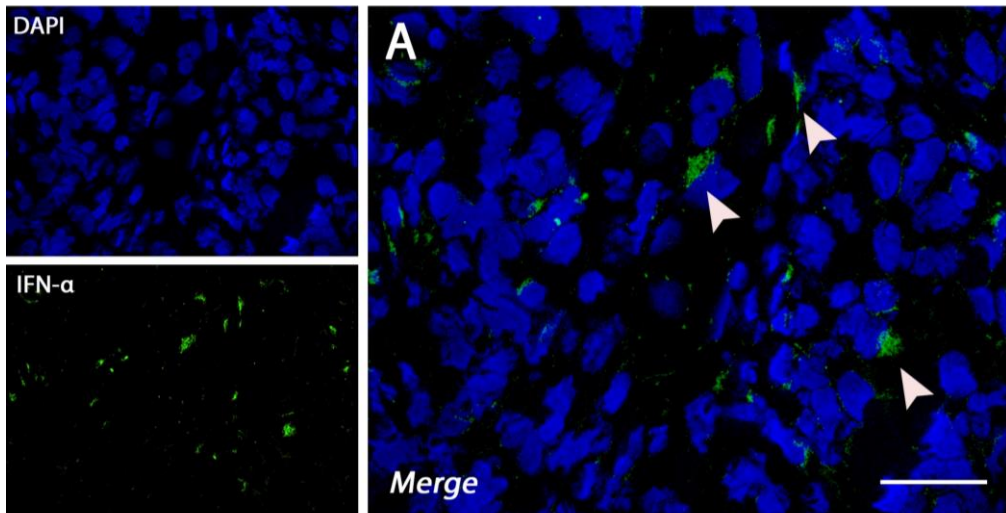
Figura 12: Análise da expressão de MX1 em células de lesões pele de pacientes com hanseníase.

Biópsias de lesões de pele de 3 pacientes com a forma lepromatosa polar que não sofreram reação (LL NR) e de 3 pacientes lepromatosos em dois momentos: no diagnóstico da hanseníase (LL) e no diagnóstico do eritema nodoso (ENH D0). As amostras foram tratadas com Trizol e as proteínas foram recuperadas através de diálise em 0,1% de SDS. A- Detecção da proteína MX1, utilizando o anticorpo policlonal de coelho anti-MX1. B- Análise por densitometria das membranas mostradas em A. A expressão de GAPDH foi considerada para controle de carregamento no gel.

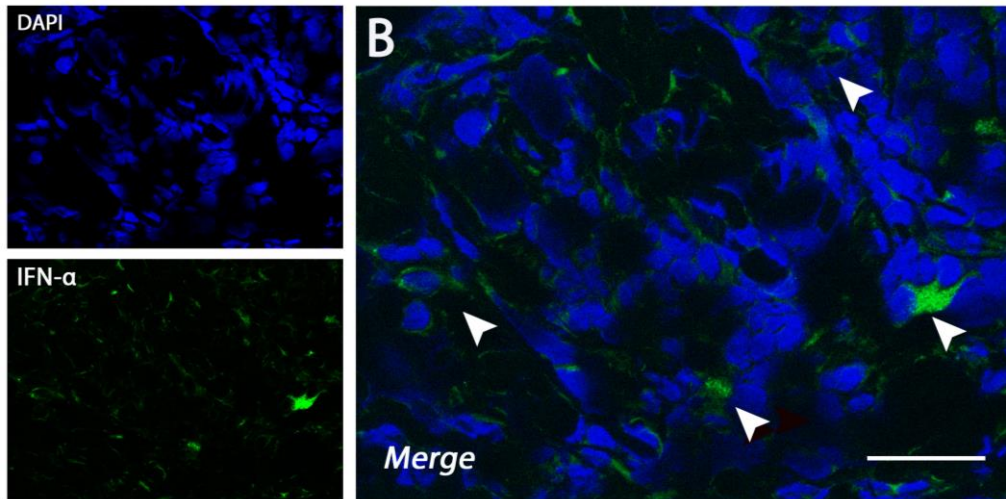
4.4- Análise da presença de IFN- α em lesões de pele obtidas de biópsias de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7

As imagens de imunofluorescência para a detecção específica de IFN- α nestas mesmas lesões estão representadas na Figura 13. Podemos observar uma coloração intensa para IFN- α no interior de algumas células na lesão LL/BL (painel A). Já na lesão ENH D0 observou-se uma marcação mais fraca, contudo em um número maior de células (painel B). Porém, a marcação para IFN- α se tornou indetectável após 7 dias de tratamento com a talidomida (ENH D7; painel C).

LL



ENH D0



ENH D7

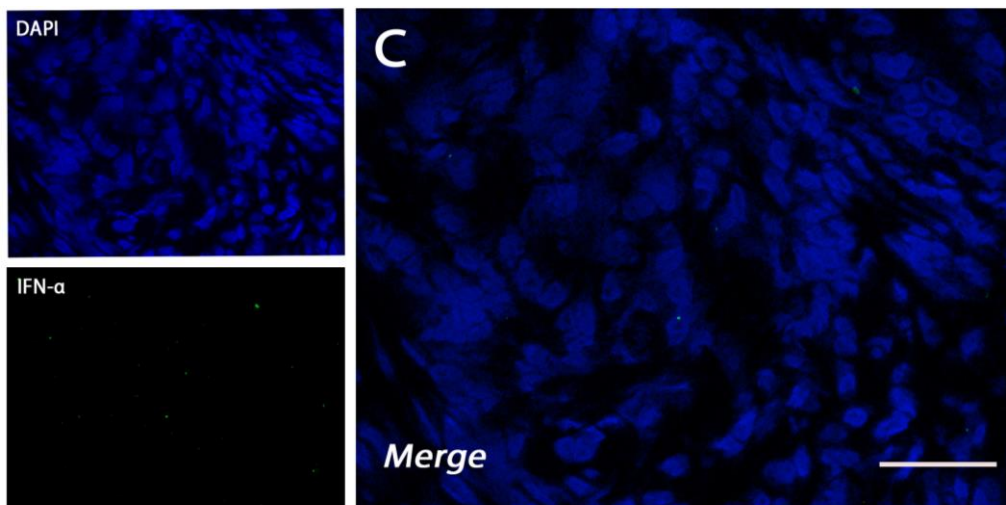


Figura 13: Análise da presença de IFN- α por imunofluorescência em lesões de pele de pacientes durante o eritema nodoso hanseniano (ENH). Pacientes multibacilares (LL/BL), pacientes ENH no diagnóstico da reação (ENH D0) e 7 dias após tratamento com talidomida (ENH D7) foram avaliados para a presença de IFN- α . Os cortes histológicos foram processados para imunomarcagem com anticorpo monoclonal de camundongo anti-IFN- α (em verde). Os núcleos são evidenciados através de coloração com DAPI (em azul). As imagens são representativas de 3 pacientes de cada grupo. As imagens são observadas no aumento de 40x. Barra de escala igual a A-100 μ m, B-200 μ m e C-100 μ m.

4.5- Análise da transcrição de genes induzidos por IFN do tipo I em sangue total de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7

O ENH é sabidamente marcado pelo aparecimento de múltiplas lesões, no entanto, além dessa marca da doença, os pacientes também apresentam sintomas sistêmicos, como febre por exemplo. Sendo assim, decidimos investigar a expressão de genes de assinatura do IFN do tipo I em amostras de sangue total. Para isso, o sangue total de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7 foi processado de acordo com protocolo do PAXgene Blood RNA. Também neste caso foram avaliados os genes *EIF2AK2*, *MX1* e *IFIT1*. A expressão do mRNA de *EIF2AK2* foi significativamente maior nos pacientes reacionais quando comparada com os pacientes não reacionais, com valor da mediana igual a 0,02712 para o grupo LL/BL e 0,5138 para ENH D0 (figura 14A). Todos os 12 pacientes LL/BL analisados mostraram níveis abaixo da mediana do grupo ENH D0. Neste caso também não observamos correlação positiva entre os níveis de mRNA e os seguintes parâmetros: IB (nos grupos LL/BL e ENH); intervalo de tempo do aparecimento do quadro reacional a partir do diagnóstico de hanseníase nos pacientes LL/BL que desenvolveram reação durante o acompanhamento; a gravidade da reação (paciente ENH). Dos 9 pacientes que foram acompanhados nos momentos dia 0 e dia 7 do tratamento com talidomida, em 4 deles se observou diminuição da expressão com o tratamento e em 3 pacientes os níveis se mantiveram praticamente inalterados (figura 14B).

Já no que se refere à expressão de *MX1*, não se observou expressão de mRNA estatisticamente diferentes nos grupos (figura 14C). Os 3 pacientes LL/BL com valores acima da mediana do grupo ENH D0 sofreram algum tipo de reação durante o acompanhamento, esses 3 pacientes apresentaram a reação em 1 e 4 anos após anos após a alta do tratamento com a PQT e 1 após 2 meses do início da PQT. Não observamos correlação positiva entre os níveis de mRNA e os seguintes parâmetros:

IB (nos grupos LL/BL e ENH); intervalo de tempo do aparecimento do quadro reacional a partir do diagnóstico de hanseníase nos pacientes LL/BL que desenvolveram reação durante o acompanhamento; a gravidade da reação (paciente ENH). Na figura 14D, devido a uma resposta muito heterogênea, não observamos diferença significativa entre os grupos. Na figura 14E, observamos a expressão de *IFIT1*, onde não houve diferença significativa entre os grupos LL/BL vs ENH D0. E, nos pacientes acompanhados no momento ENH D0 e ENH D7 na figura 14F, também não observamos diferença significativa entre os grupos, devido a expressão relativamente mais baixa desse gene.

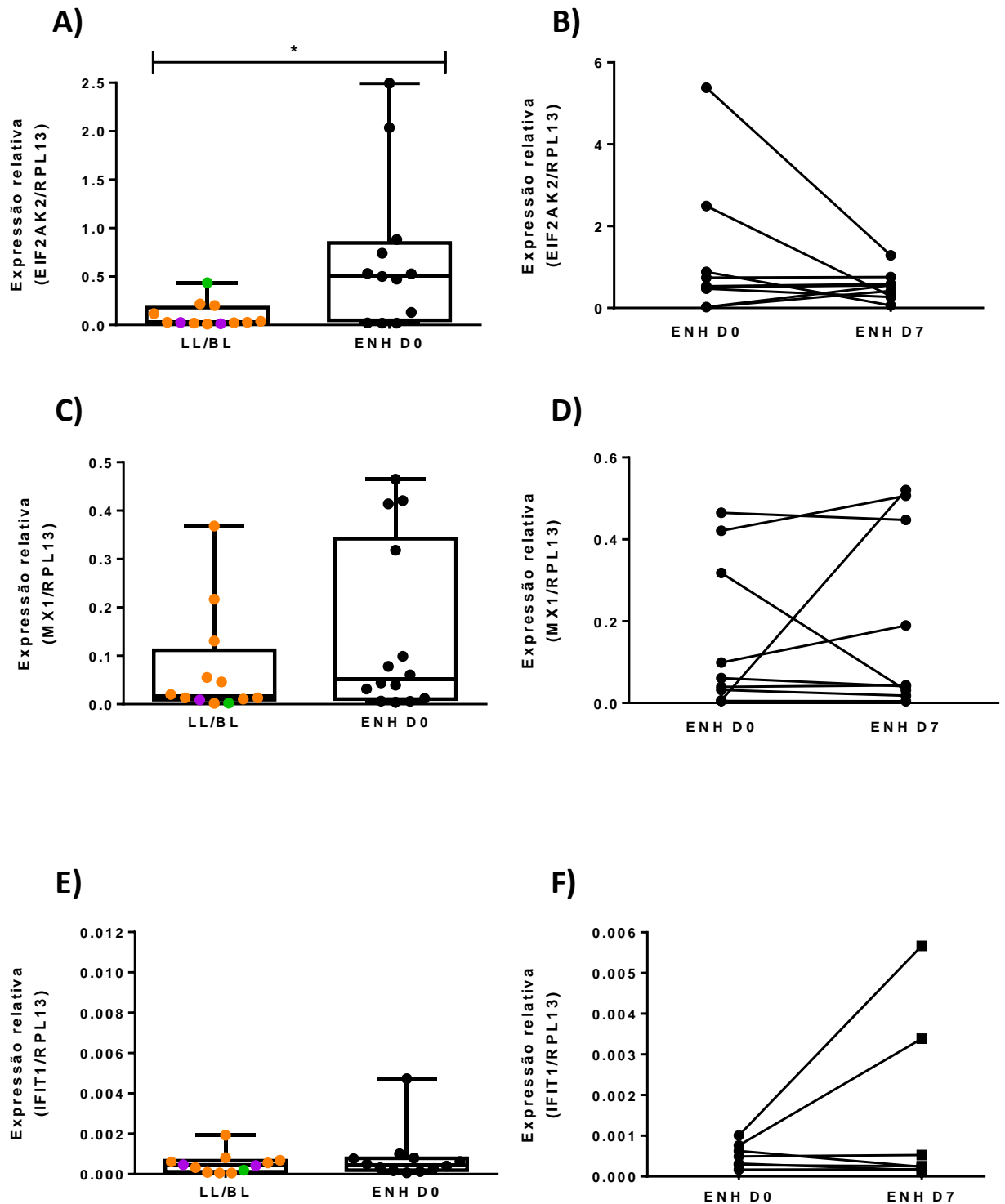


Figura 14: Análise da expressão relativa dos genes induzidos por IFN do tipo I em sangue total de pacientes com eritema nodoso hanseniano (ENH). Os valores das amostras foram normalizados utilizando o controle endógeno RPL13. Cada ponto representa 1 paciente, e a cor verde indica os pacientes multibacilares (LL/BL) que evoluíram para o ENH durante seu acompanhamento, a cor laranja os que evoluíram para reação reversa e a cor roxa os que não apresentaram reação. A- Análise do gene EIF2AK2 em pacientes multibacilares (LL/BL=12,) e pacientes ENH no diagnóstico da reação (ENH D0=12). B- Análise do mesmo gene em pacientes ENH monitorados 7 dias após o início de

tratamento com talidomida (ENH D7, n=9). C- Análise da expressão do gene MX1 (LL/BL=12, ENH D0=14). D- Análise do mesmo gene em pacientes acompanhados longitudinalmente ENH D0 e ENH D7 (n=7). E- Análise da expressão do gene IFIT1 (LL/BL=12, ENH D0=13). F- Análise do mesmo gene em pacientes acompanhados longitudinalmente ENH D0 e ENH D7 (n=7). As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste t de Student, seguido do Mann Whitney test ($P < 0.05$).

4.6- Quantificação da concentração sérica de IFN do tipo I em pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7

Para quantificar IFN do tipo I no soro dos pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7 utilizamos o Kit *HEK-Blue™ IFN- α/β Cells*, que mede a atividade biológica desta citocina. As células HEK-Blue expressam o receptor de IFN-I e ao estimular essas células com IFN- α/β secretam em seu sobrenadante uma fosfatase alcalina que é detectada pelo ensaio colorimétrico QUANTI-Blue™. Para quantificar os níveis de IFN-I utilizando este kit, construímos uma curva padrão (figura 15A) estabelecendo como limite de detecção de IFN-I o valor de 9.75 U/mL. Foram analisadas amostras de soro de 13 pacientes de cada grupo, contudo não foram encontrados níveis detectáveis de IFN-I pelo método utilizado em nenhuma amostra analisada (figura 15B).

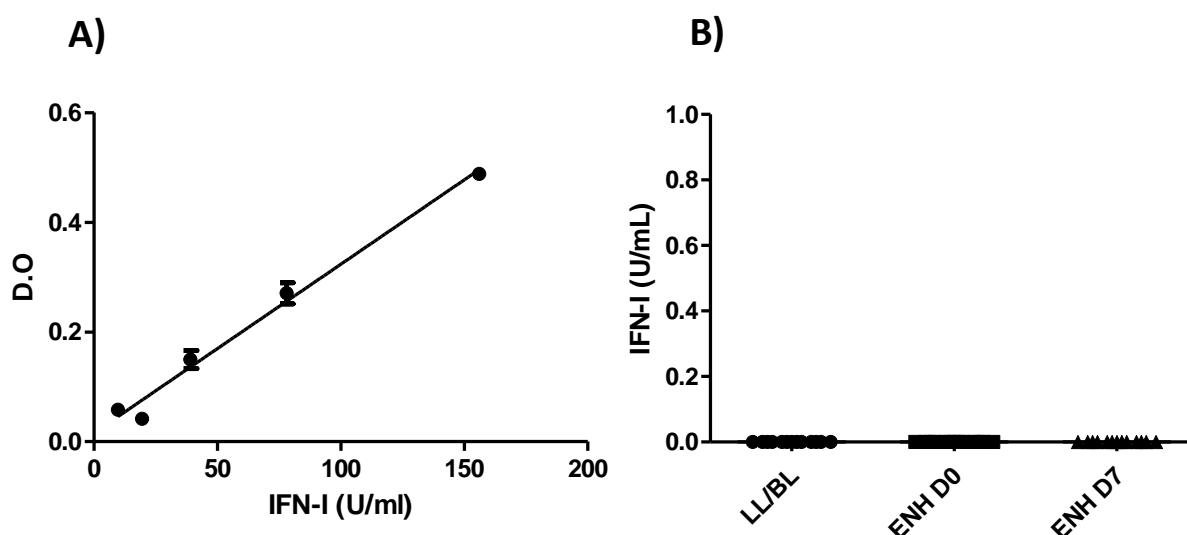


Figura 15: Nível de IFN do tipo I no soro dos pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7. Amostras de soro de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7, foram utilizadas para o ensaio. As células HEK 293 foram plaqueadas em placas de 96 poços e estimuladas com concentrações crescentes de IFN- α 2b para

construção da curva padrão (A), ou 20 μ L das amostras de soro dos pacientes (B). Após incubação por 20-24 horas, o sobrenadante foi coletado, e a dosagem foi realizada pelo kit QUANTI-Blue. A leitura foi realizada em um espectrofotômetro com a densidade ótica de 620-655 nm.

4.7- Análise da capacidade do IFN- α de potencializar a NETose induzida por *M. leprae*

Recentemente, Silva e colaboradores (2019) observaram que os neutrófilos de pacientes ENH apresentam taxas aumentadas de NETose, e que o *M. leprae* é capaz de induzir a produção de NETs. Como o IFN-I tem a propriedade de preparar os neutrófilos potencializando a NETose (Revisto em Mahajan *et al.*, 2016; Gul *et al.*, 2018), numa etapa seguinte avaliamos se o IFN- α seria capaz de aumentar a geração de NETs por neutrófilos estimulados com sonicação total do *M. leprae*. Para isso, neutrófilos foram purificados do sangue de doadores sadios e estimulados com *M. leprae* sonicado, na presença ou não do IFN- α . Na figura 16A nossos resultados mostram que o IFN- α possui a capacidade *per se* de induzir NETose. Também confirmamos a capacidade do *M. leprae* de induzir NETose. Contudo, nas condições testadas não observamos um efeito significativo do IFN-I de potencializar a NETose induzida por *M. leprae*.

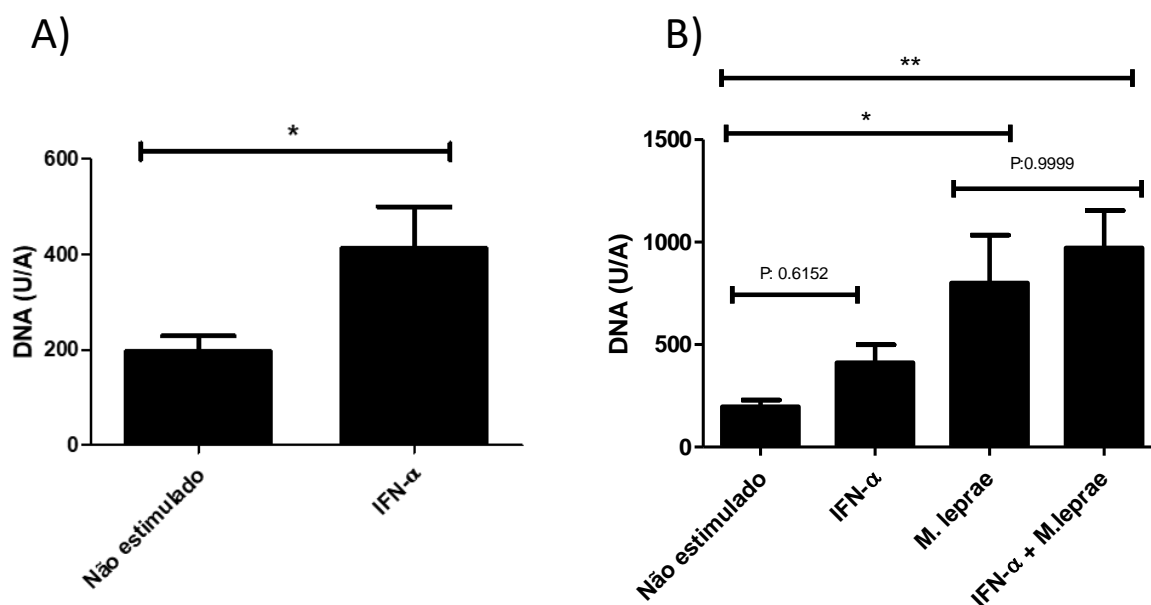


Figura 16: Análise da capacidade do IFN- α de potencializar a NETose induzida por *M. leprae*. Neutrófilos (1×10^6 células) de doadores sadios (N=6) estimulados com IFN- α 1000 U/mL, *M. leprae*

sonicado 20µg/mL e IFN-α 1000 U/mL + *M. leprae* sonicado 20 µg/mL, durante 4 horas e 30 minutos. A análise estatística foi realizada utilizando o teste t de Student, seguido do Mann Whitney test e One-way ANOVA seguido Kruskal-Wallis test com Dunn's Multiple Comparison Test (P <0.05).

4.8- Análise da produção de IFN-I por PBMCs de pacientes multibacilares LL/BL e ENH

Numa última etapa do trabalho fomos avaliar a produção espontânea e após estimulação de IFN-I em PBMCs de pacientes LL/BL e ENH. As células foram purificadas e estimuladas com *M. leprae* sonicado, complexo CpG-Hlp (agonista de TLR-9) e R848 (agonista de TLR-7). Nossos resultados iniciais (figura 17A) demonstram que PBMCs de pacientes multibacilares LL/BL respondem ao estímulo com complexo CpG-Hlp e R848 resultando na produção de IFN-I. Já PBMCs de pacientes ENH demonstram uma produção de IFN-I somente com estímulo com CpG-hlp. Não observamos produção espontânea de IFN-I e nem nas células estimuladas com *M. leprae* sonicado nos dois grupos de pacientes.

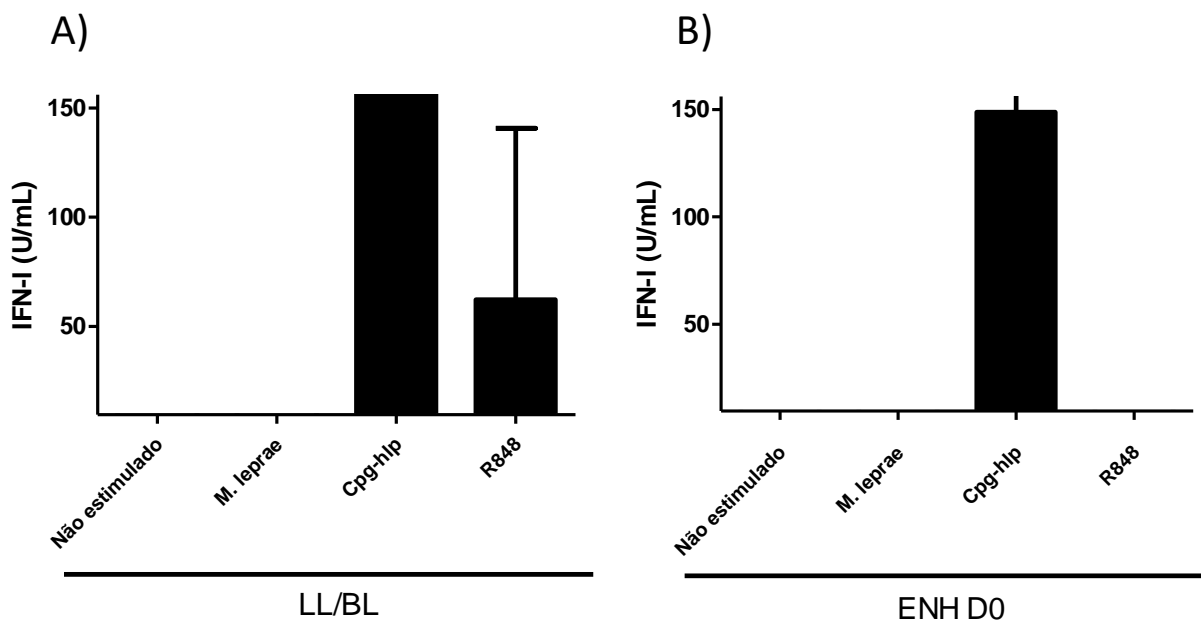


Figura 17: Análise da produção do IFN-I por PBMCs de pacientes multibacilares LL/BL e ENH D0. PBMCs (1×10^6 células) de pacientes multibacilares LL/BL (N=3) e ENH D0 (N=2) estimulados com *M. leprae* sonicado (20 µg/mL), complexo CpG-Hlp (0,5 e 0,25 µM/mL) e R848 (1 µg/mL), durante 24 horas.

5. DISCUSSÃO

Os indivíduos que manifestam a forma clínica multibacilar da hanseníase desenvolvem uma resposta imune fraca ou ineficaz *M. leprae* específica com produção de IFN- γ , importante para o controle de patógenos intracelulares, permitindo uma multiplicação irrestrita do *M. leprae* com a consequente disseminação e aparecimento de múltiplas lesões. Um dos aspectos mais intrigantes da hanseníase é o surgimento durante o seu curso crônico de episódios inflamatórios agudos que são chamados de episódios reacionais. No caso dos pacientes multibacilares, estes apresentam uma chance de 30 a 50% de desenvolver a reação do tipo 2 ou eritema nodoso hanseniano (ENH). O ENH é uma intercorrência grave que pode exigir a internação do paciente e levá-lo a óbito. Os mecanismos que disparam e que mantêm esse episódio reacional são desconhecidos, e o seu melhor entendimento poderá contribuir para a descoberta de novas terapias e diagnóstico precoce (Revisto em Kamath *et al.*, 2014).

Em estudos anteriores do laboratório, identificou-se que a via de resposta imune inata mediada pela ativação de TLR-9 está envolvida na patogênese do ENH (Dias *et al.*, 2016). Fazendo um paralelo com outros processos inflamatórios que mostram algumas semelhanças com o ENH, como o LES e a psoríase, esta via tem papel fundamental na estimulação da produção de IFN- α , tendo como fonte principal as células pDCs. O IFN- α produzido nestas patologias atua, por sua vez, sobre várias células do sistema imune alterando suas funções e tendo como consequência a amplificação e perpetuação do processo inflamatório (Revisto em Guiducci *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2015; Barrat and Su, 2019). Sendo assim, neste trabalho lançamos a hipótese de que a ativação de TLR-9 poderia estar contribuindo para a produção de IFN-I durante o ENH, e que esta família de citocinas participaria, assim, da patogênese deste episódio reacional.

Em nosso trabalho avaliamos a atividade do IFN-I a partir da análise da expressão de três genes induzidos por IFN-I: *EIF2AK2*, *MX1* e *IFIT1*. Nossa escolha foi baseada em diversos estudos de LES, que utilizam esses genes para mensurar de forma específica a atividade do IFN- α , principal membro da família de IFN-I implicado na patogênese da doença (Wahadat *et al.*, 2018). Contudo, estes mesmos genes também são induzidos pelo IFN- β , como demonstrado recentemente em estudo que comparou os genes regulados por IFN- α , IFN- β e IFN- γ em células mononucleares

sanguíneas de doadores sadios (Walddell *et al.*, 2010). Inicialmente investigamos a expressão desses genes na lesão cutânea de pacientes multibacilares não reacionais e comparamos com a expressão em lesões novas surgidas durante o ENH. A expressão do gene *IFIT1* foi detectada em poucas amostras clínicas. Em contrapartida, RNAm de *EIF2AK2* e *MX1* foi detectado em alguns pacientes LL/BL e na maioria dos pacientes ENH. Esses resultados sugerem um aumento da atividade de IFN-I, durante o episódio reacional na lesão cutânea e reforçam a idéia de que o IFN-I pode ter um papel importante na amplificação do processo inflamatório observado no ENH. A baixa expressão gênica observada nos pacientes LL/BL foi uma surpresa. O resultado esperado era que uma assinatura de IFN-I fosse claramente observada na lesão lepromatosa não reacional frente a dados da literatura recentemente publicados. Teles e colaboradores (2013) mostraram, através de uma análise transcricional em larga escala, uma alta expressão de genes induzidos especificamente por IFN- β , mas não por IFN- α , em lesões cutâneas de pacientes com as formas multibacilares LL/BL da hanseníase, contrapondo-se a uma assinatura gênica condizente com a produção de IFN- γ em pacientes do polo tuberculoide da doença. Esta indução foi descrita como sendo estratégica para a sobrevivência e multiplicação do bacilo no organismo devido aos efeitos do IFN- β de antagonizar a ação microbicida de IFN- γ em macrófagos infectados com o *M. leprae* (Teles *et al.*, 2013). Contudo, dentre os genes destacados como compondo a assinatura de IFN-I nas lesões lepromatosas, não se encontravam os genes avaliados no nosso estudo, o que talvez possa justificar a baixa expressão destes genes nas nossas amostras de lesão LL/BL.

Já a análise por *western blotting* da proteína *MX1* mostrou abundância tanto nas lesões LL/BL como ENH, indicando atividade de IFN-I em ambos grupos. Este dado foi concordante com a detecção de IFN- α nas lesões LL/BL e ENH por imunofluorescência. Nesta análise observou-se um número aumentado de células positivas para IFN- α nas lesões reacionais, coincidindo com a maior expressão genica de *EIF2AK2* e *MX1* nestas lesões. Contudo, o dado de imunofluorescência deve ser futuramente quantificado para maior precisão deste resultado. A detecção de IFN- α na lesão LL/BL discordam parcialmente aos resultados de Teles e colaboradores, 2013, que preferencialmente encontraram IFN- β nesta lesão (Teles *et al.*, 2013).

No nosso estudo os pacientes incluídos no grupo LL/BL apresentaram ENH um tempo depois de nossa avaliação, o que poderia sugerir que a expressão de IFN- α

poderia ser um fator importante para a ocorrência da reação. No entanto não houve correlação com o tempo que os pacientes apresentaram ENH. Sendo assim, complementando nossa análise, também avaliamos a expressão da proteína *MX1* em pacientes multibacilares LL/BL que não desenvolveram ENH. Nossos resultados indicam que não há diferença na expressão de *MX1* entre pacientes LL/BL que não desenvolveram o ENH e pacientes que desenvolveram o ENH em algum momento do curso da hanseníase. No entanto nosso tempo de observação destes pacientes não reacionais ainda é curto, visto que são pacientes acompanhados apenas desde 2017, e os pacientes por muitas vezes desenvolvem reação anos após a conclusão do tratamento com a poliquimioterapia. Também, como *MX1* é positivamente regulada tanto pelo IFN- α como pelo IFN- β , ainda não podemos descartar um papel preponderante de IFN- α na patogênese da reação. Assim, novos ensaios deverão ser realizados futuramente com estas amostras, buscando marcadores específicos que diferenciem IFN- α de IFN- β para comprovar esta hipótese.

O ENH é uma doença inflamatória que apresenta alguns sintomas sistêmicos como febre, mal-estar, dores nas articulações e perda de peso, que causam extremo desconforto nos pacientes acometidos. Devido a esses fatores avaliamos a transcrição do mRNA de genes induzidos por IFN-I em amostras de sangue total de pacientes multibacilares LL/BL e reacionais ENH. Em nossos resultados podemos observar através da análise da mediana que os níveis de mRNA para o gene *EIF2AK2* foi 18 vezes maior nos pacientes ENH em comparação com os pacientes não reacionais. No entanto, a expressão gênica de *MX1* e *IFIT1* não apresentou diferença entre os pacientes não reacionais e os pacientes ENH. Esses resultados em sangue total se correlacionam com os dados em lesão cutânea, visto que o gene com maior nível de transcrição de mRNA também foi o *EIF2AK2*. Além disso, a transcrição do gene *MX1* se correlaciona com os níveis da proteína *MX1* na lesão cutânea, visto que não observamos diferenças na expressão do mRNA para *MX1* no sangue, e não observamos diferença nos níveis da proteína *MX1* na lesão cutânea, comparando pacientes multibacilares LL/BL e ENH. Esses dados sugerem que possivelmente os achados encontrados em lesões cutâneas podem ser reflexo dos dados encontrados sistemicamente.

O IFN do tipo I compreende uma família de citocinas que possui 13 subtipos de IFN- α e um único IFN - β em humanos. Essas citocinas são mais conhecidas por sua capacidade de induzir um estado antiviral na célula infectada e favorecer a geração

de uma resposta imune adaptativa para controle da infecção (Revisto em McNab *et al.*, 2015). Contudo, dados recentes indicam que os efeitos deste grupo de citocinas é bastante complexo combinando tanto efeitos benéficos como maléficos para o hospedeiro (Rodero *et al.*, 2017). Essa família de citocinas liga-se a um único receptor transmembranar heterodimérico composto pelas subunidades IFNAR1 e IFNAR2. Essa ligação irá ativar uma cascata de sinalização que induz a expressão de centenas de genes estimulados por IFN (ISGs). Mas as respostas celulares à ligação com IFNAR são dependentes do tipo de IFN-I e do contexto celular e variam durante o curso de uma resposta imune (Revisto em McNab *et al.*, 2015). Estudos recentes sugerem que os diferentes subtipos de IFN-I possuem funções específicas, e podem induzir a expressão de diferentes genes, que são regulados especificamente por IFN- α ou IFN- β . Contudo este ainda é um campo bastante desconhecido que requer investigação (Revisto em Cherie *et al.*, 2015). Novos ensaios de qPCR para os genes IFN- α e IFN- β lesões lepromatosas e ENH poderão esclarecer melhor esta questão no contexto do papel dos diferentes membros da família IFN-I na hanseníase e nos episódios reacionais.

A talidomida é o tratamento de escolha para pacientes com ENH, e possui um efeito extremamente benéfico em um curto período de tempo. Nossos resultados mostraram uma efetiva diminuição da atividade de IFN-I após 7 dias do início do tratamento dos pacientes ENH com talidomida. Observamos tanto a quase extinção de células produtoras de IFN- α como diminuição dos níveis de *MX1* na lesão e, o acompanhamento longitudinal de alguns pacientes ENH mostrou queda na expressão de *EIF2AK2* e *MX1* em boa parte deles, tanto na lesão como no sangue. Nossos dados sugerem que uma das propriedades anti-inflamatórias da talidomida é a supressão da via de IFN-I em pacientes com ENH.

Vários mecanismos para a eficácia da talidomida no ENH têm sido propostos, sendo considerado o principal a inibição da produção de TNF (Revisto em Kamath *et al.*, 2014). Durante muito tempo permaneceu desconhecido o mecanismo de ação da talidomida. No entanto, recentemente foi identificado o alvo de ação direta da talidomida, o cereblon, responsável por seus diversos efeitos. A talidomida possui propriedades anti-inflamatórias muito eficazes, que permite que tenha um efeito tão rápido e eficaz nos pacientes com ENH. Recentemente um estudo demonstrou que a talidomida e seus derivados são inibidores eficazes da produção de IFN-I induzido por TLR4, via supressão da via TRIF/IRF3 em camundongos deficientes do cereblon.

Esses dados mostram que a supressão de IFN-I ocorre independente do cereblon. Isso tem grande importância, pois indica que algumas propriedades terapêuticas da talidomida e seus derivados podem ser separadas das vias que levam à teratogenicidade (Milrine *et al.*, 2016). Outro trabalho recente identificou o regulador da homeostase imune Rabex-5, uma proteína que interage com o cereblon. Eles observaram que a ligação de Rabex-5 ao cereblon é inibida pela lenalidomida, um derivado da talidomida. Utilizando a linhagem celular de macrófagos THP-1 deficiente do Rabex-5, eles identificaram que a ausência de Rabex-5 regulou positivamente a produção de IFN-I, induzida por TLR através da ativação de uma via da STAT1 dependente de MYD88 (Milrine *et al.*, 2016). Nossos resultados indicam que o tratamento com talidomida regula negativamente a expressão de ISGs na lesão e sangue, assim como a presença do IFN- α na lesão de pacientes ENH analisados após 7 dias do início do tratamento com a talidomida.

Apesar de já ter passado muitos anos desde a sua descoberta, uma compreensão do papel dos diferentes subtipos de interferon tem sido dificultada pela incapacidade de medir diretamente a proteína do IFN-I em amostras biológicas usando kits de ELISA disponíveis (Bonjardim *et al.*, 2009; Rodero *et al.*, 2017). Por esse motivo, a maioria dos trabalhos utilizam um método indireto para medir a presença do IFN-I, que se baseia na identificação do mRNA de genes de assinatura do IFN-I, conhecidos como ISGs. Dessa forma é possível identificar um sinal amplificado consequente do estímulo do IFN-I (Bennett *et al.*, 2003; Walddell *et al.*, 2010; Teles *et al.*, 2013). No entanto, os esforços para medir diretamente o IFN-I ainda continuam.

Em nosso trabalho utilizamos um ensaio biológico que mede a atividade do IFN-I para tentar quantificar os níveis séricos de IFN-I nos pacientes com hanseníase. Este ensaio se utiliza de células HEK 293 que expressam o receptor de IFN-I e foram transfectadas com os genes *STAT2* e *IRF9*, para obter uma via de sinalização de IFN-I totalmente ativa. Essas células possuem um gene repórter *SEAP* (fosfatase alcalina embrionária secretada) que é controlada pelo promotor ISG54 induzido por IFN- α/β . Através desse ensaio realizamos a quantificação do IFN-I em amostras de soro de pacientes LL/BL, ENH D0 e ENH D7, com um limite de detecção de 9.5 U/mL. No entanto, apesar dos nossos esforços, não identificamos a presença do IFN-I em nenhuma das amostras testadas. Este mesmo resultado já havia sido obtido pelo nosso grupo utilizando um ensaio de ELISA (pbl Assay science) com limite de

detecção 12.5 pg/mL (dados não publicados). Num estudo anterior realizado na Fiocruz, a presença do IFN- α foi detectada através de radioimunoensaio em 4 amostras de soro de um total de 25 pacientes ENH, com valores entre 10 e 20 U/mL. A maior parte dos pacientes apresentou níveis de IFN- α abaixo de 10 U/mL (Vieira, 1991).

À semelhança dos nossos resultados, muito poucos estudos conseguiram mensurar os níveis circulantes desta citocina em doenças inflamatórias crônicas onde o IFN-I tem importante papel patogênico. O IFN-I estava presente no soro de 46% dos pacientes com LES, 50% dos pacientes com artrite reumatoide, e 60% dos pacientes com escleroderma. Os pacientes com LES apresentaram uma detecção entre 0 e 32 U/mL de IFN-I no soro, e esses dados tiveram uma boa correlação com a atividade da doença (Hooks *et al.*, 1979). Um outro estudo identificou a presença do IFN- α no soro de pacientes com LES. Os autores realizaram um acompanhamento longitudinal dos pacientes e observaram que antes da crise os pacientes apresentavam uma detecção média de 4,3 U/mL de IFN- α , com um aumento expressivo durante a crise com uma média de 30 U/mL. Após a crise os pacientes apresentavam níveis baixos de IFN- α de aproximadamente 2,9 U/mL. Esses resultados também tiveram alta correlação com a gravidade da doença, ocorrendo um aumento maior da detecção de IFN- α em pacientes com doença grave ativa. A detecção do IFN- α foi observada em 43% dos pacientes analisados nesse estudo (Bengtsson *et al.*, 2000). Esses resultados refletem que os níveis de IFN-I circulantes são extremamente reduzidos, possivelmente devido à alta potência biológica dessa citocinas, fazendo com que ela seja consumida rapidamente para exercer suas atividades biológicas.

Recentemente, um estudo utilizou uma tecnologia inovadora, a tecnologia de um ELISA digital, baseado na contagem de imuno-complexos individuais detectados com esferas paramagnéticas combinadas a anticorpos de alta afinidade. Dessa forma foi possível identificar concentrações atômicas (femtogramas por mililitro), que correspondeu a uma sensibilidade 5.000 vezes maior que os ELISAs comerciais. Os autores identificaram a presença de IFN- α em amostras de soro de pacientes com LES e dermatomiosite de início juvenil (DMJ), que foi altamente correlacionado com a expressão de ISGs. Esses dados reforçam a necessidade de um método mais sensível para detecção do IFN-I, mas também demonstram que o método mais utilizado atualmente, que é baseado na identificação da expressão de ISGs, é um método eficaz (Rodero *et al.*, 2017).

Uma característica importante dos pacientes multibacilares LL/BL é a presença de uma resposta imune humoral, e a presença de auto-anticorpos (Misch *et al.*, 2010). Recentemente nosso grupo demonstrou um aumento de DNA micobacteriano e de complexo DNA-histona humano no soro de pacientes ENH, associado com a alta expressão de TLR-9 em células B, pDC e monócitos, sugerindo que o DNA bacteriano e do hospedeiro poderiam agir como importantes estimuladores de TLR-9 (Dias *et al.*, 2016). Estudos no LES descreveram um aumento da expressão de TLR-9 em células B na doença ativa, e também foi visto que a interação entre CpG (dinucleotídeo não metilado) e TLR-9 é capaz de induzir o aumento da geração de auto-anticorpos (Nakano *et al.*, 2008). Diversas doenças inflamatórias e auto-imunes já demonstraram o papel patogênico de imunocomplexos de ácido nucléico endógeno e auto-anticorpos, que através da sinalização de TLR-7 e TLR-9 induzem a produção elevada de citocinas pró-inflamatórias (Revisto em Guiducci *et al.*, 2009). As pDCs, por exemplo, são ativadas dessa forma e secretam altos níveis de IFN-I no LES. O IFN-I, por sua vez, contribui para a perda de tolerância como consequência da ativação de células T e B autorreativas seguida da produção de auto-anticorpos (Revisto em Rönnblom *et al.*, 2008).

Os neutrófilos parecem desempenhar um papel importante na patogênese do ENH. A presença de neutrófilos na derme profunda e no tecido subcutâneo em lesões ENH é considerada uma assinatura celular e tem um papel importante no diagnóstico histopatológico. A presença de neutrófilos é reduzida após tratamento anti-reacional (Schmitz *et al.*, 2019). A integração de dados em dois estudos de expressão gênica em larga escala realizados por dois grupos independentes (Lee *et al.*, 2010; Belone *et al.*, 2015) em lesões de pele ENH revelou as principais vias biológicas que diferenciam as lesões ENH das lesões não reacionais de pacientes multibacilares. As vias biológicas majoritariamente expressas são envolvidas nos processos de degranulação e ativação de neutrófilos (Calvo, 2018). Já foi demonstrado que a taxa de apoptose de neutrófilos se encontra muito acelerada em pacientes ENH em comparação com pacientes multibacilares LL/BL não reacionais. Além disso, neutrófilos isolados de pacientes com hanseníase LL/BL e ENH liberam TNF e IL-8, após estimulação com *M. leprae* (Oliveira *et al.*, 1999).

Dados recentes do nosso grupo demonstraram que neutrófilos de pacientes ENH apresentam taxas aumentadas de NETose, sugerindo que as NETs liberadas por este processo poderiam constituir uma fonte importante dos níveis circulantes

elevados de DNA endógeno detectados nesses pacientes. Neste trabalho também demonstramos que componentes do *M. leprae*, encontrados em abundância no paciente multibacilar, são capazes de induzir NETose (Silva *et al.*, 2019).

A depuração ineficiente de NETs durante a etiopatogenia do LES tem sido correlacionada com altos títulos de anticorpos anti-NET e envolvimento renal desses pacientes. A NETose é induzida pelas citocinas pró-inflamatórias IL-17A, TNF, IL-8 e IL-1 β na artrite reumatoide, gota e LES. O IFN- α é uma citocina importante, com capacidade de induzir os neutrófilos para a realização da NETose e, como a assinatura de IFN- α é uma característica importante do LES, as NETs podem ser consideradas como parte da patogenia do LES. Ainda foi demonstrado que neutrófilos de pacientes com LES produzem IFN- α em resposta à cromatina circulante. Dessa forma, acredita-se que o IFN- α pode estar ativando os neutrófilos, e induzindo um aumento na geração de NETose (Mahajan *et al.*, 2016; Gul *et al.*, 2018).

Partindo do pressuposto de que existe uma assinatura de IFN-I nos pacientes ENH, numa etapa seguinte deste trabalho nos perguntamos, baseado nos dados descritos acima, se o IFN- α poderia contribuir para as altas taxas de NETose observadas em pacientes ENH. Nossos resultados revelaram que o IFN- α *per se* é capaz de induzir NETose em neutrófilos saudáveis, confirmando dados da literatura (Gul *et al.*, 2018). Contudo IFN- α não parece potencializar a indução da geração de NETs pelo *M. leprae* sonicado *in vitro* em neutrófilos de indivíduos saudáveis. Novos experimentos utilizando neutrófilos isolados de pacientes LL/BL e ENH serão realizados para uma melhor definição do papel de IFN-I na NETose observada durante a reação.

Recentemente foi demonstrado o aumento na frequência de células T CD8⁺/TNF⁺ de memória efetora no ENH comparado com pacientes multibacilares LL/BL. E também foi visto a frequência reduzida de células T CD4 e CD8⁺ produtoras de IFN- γ . Esses dados sugerem que as células T CD8⁺/TNF⁺ de memória efetora são as principais responsáveis pela alteração transitória na resposta imune ao *M. leprae* em pacientes com ENH (Silva *et al.*, 2019). Esses dados corroboram com um trabalho anterior que também demonstrou o aumento da ativação de células T em pacientes com ENH e aumento da porcentagem média de células T CD8⁺ em pacientes ENH (Negera *et al.*, 2017).

O IFN-I pode ter um papel importante durante respostas de células T descritas durante o ENH. Diversos trabalhos demonstram um papel relevante do IFN-I em infecções virais, podendo ter efeitos inibitórios e estimulatórios da sobrevivência e proliferação de células T, além de modular a produção de citocinas por células T. Por exemplo, o IFN-I pode promover sinais que inibem o crescimento de células T CD8⁺. Por outro lado, nas células T CD8⁺ ativadas durante a infecção pelo vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) e vírus da estomatite vesicular (VSV), o IFN-I também pode promover a sobrevivência e expansão clonal da célula T CD8⁺. Uma possível explicação para esses resultados opostos está na sinalização diferencial do STAT *downstream* do IFNAR, porque na ausência do STAT1 em células T, o IFN-I fornece sinais pró-sobrevivência e mitogênicos possivelmente através de STAT3 e STAT5, em vez de sinais anti-proliferativos através do STAT1 (McNab *et al.*, 2015). A ativação excessiva de células T tem sido descrita em muitos estudos gerando dano tecidual em diversas doenças inflamatórias. Dessa forma não se pode descartar um papel para o IFN-I como agente importante na indução das células T durante o ENH, sendo necessário um estudo mais profundo para esclarecer tais questionamentos (Negera *et al.*, 2017).

Concluindo, nossos dados sugerem que o IFN- α é regulado positivamente durante o ENH, e que a talidomida exerce um efeito sobre essa via, favorecendo a remissão dos sintomas. Nós acreditamos que a ativação de TLR-9 pelo complexo DNA-Hlp micobacteriano e por DNA endógeno (proveniente por exemplo de neutrófilos que sofreram NETose e ora complexado a histonas ou formando imunocomplexos com autoanticorpos) seja uma via majoritária na indução de IFN-I e outras citocinas inflamatórias durante o ENH. O incremento de IFN-I e citocinas inflamatórias, por sua vez, aumentaria as taxas de NETose provocando um aumento na liberação de auto-antígenos. O IFN-I tem diversos efeitos sobre as células do sistema imune, como promover a sobrevivência, ativação e diferenciação de células B autorreativas em plasmócitos produtores de autoanticorpos. Estes anticorpos formariam imunocomplexos com o DNA e proteínas das NETs, que por sua vez ativariam pDC a produzir mais IFN- α amplificando, assim, o processo inflamatório.

Devido ao seu papel na patogênese de doenças inflamatórias crônicas e autoimunes, o bloqueio da via do IFN-I vem sendo considerado um alvo atraente para uso terapêutico. Algumas abordagens terapêuticas para inibir a ação do IFN-I já estão em andamento e sendo testadas em ensaios clínicos. Existem terapias baseadas no

bloqueio do receptor do IFN-I, outras que bloqueiam diretamente o IFN- α , além de algumas que bloqueiam a via Tyk2-JAK1 que leva à transcrição de ISGs. Além disso, a pDC, a principal produtora de IFN-I, também é alvo de estudo. Já foi visto que a diminuição de pDCs usando B1B059, um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao receptor de pDC BDCA2, levou a redução de sinais de IFN-I. Ainda existem terapias que tem como alvo os receptores sensores de ácido nucleico, como TLR-7/9, impedindo a produção de IFN-I. Essas terapias podem ter benefícios, mas ainda estão em avaliação (revisto por Barrat & Su, 2019). Baseado nos resultados do nosso estudo, é válido pensar que alguma dessas novas abordagens poderiam ter um efeito benéfico em pacientes com ENH, melhorando os sintomas e progressão da doença.

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, nós concluímos que:

- 1- A expressão de genes induzidos por IFN-I em lesão cutânea de pacientes ENH mostrou-se elevada quando comparada com pacientes multibacilares LL/BL.
- 2- A expressão da proteína MX1 em lesões cutâneas foi semelhante em pacientes multibacilares não reacionais ou em reação.
- 3- Após 7 dias do início do tratamento com a talidomida, os níveis de transcrição de genes induzidos por IFN-I e níveis da proteína MX1 foram reduzidos em lesões cutâneas de pacientes ENH.
- 4- Os níveis da proteína MX1 em lesão cutânea de pacientes LL/BL que até o presente momento não desenvolveram o ENH e de pacientes LL/BL que desenvolveram o ENH durante o acompanhamento foram semelhantes.
- 5- A presença do IFN- α foi observada em lesões cutâneas de pacientes multibacilares LL/BL e ENH, e o tratamento com a talidomida causou uma diminuição acentuada desta citocina.
- 6- Os níveis de mRNA de genes induzidos por IFN-I em sangue total de pacientes ENH se mostraram elevados quando comparados com pacientes multibacilares LL/BL.
- 7- Após 7 dias do início do tratamento com a talidomida, os níveis de transcrição de genes induzidos por IFN-I foram muito heterogêneos no sangue, sugerindo que possivelmente o período observado no estudo não foi suficiente para a detecção de um efeito sistêmico do fármaco.
- 8- O IFN-I não foi detectado no soro de pacientes multibacilares LL/BL, ENH e ENH após 7 dias do início do tratamento com a talidomida.

- 9- O IFN-I foi capaz de induzir NETose em neutrófilos de indivíduos sadios *in vitro*. Contudo, o IFN-I não teve um efeito significativo em potencializar a NETose induzida pelo *M. leprae* nas condições testadas.

Concluindo, nossos dados sugerem que o IFN- α é regulado positivamente durante o ENH, e que o tratamento com a talidomida bloqueia esta via, possivelmente favorecendo a remissão dos sintomas. Atualmente existem terapias farmacológicas baseadas no bloqueio do IFN- α em aprimoramento que futuramente, após alguns ensaios para confirmar o papel do IFN- α durante o ENH, poderão ser alternativas benéficas para o manejo de pacientes ENH.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bandurska K, Król I, & Myga-Nowak M. Interferons: between structure and function. *Postepy Hig Med Dosw.* 2014. 68:428-440.

Barrat FJ & Su L. A pathogenic role of plasmacytoid dendritic cells in autoimmunity and chronic viral infection. *J. Exp. Med.* 2019.

Bonjardim, CA, Ferreira, PC. & Kroon, EG. Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol Lett.* 2009. 122:1-11.

Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm G, H Vallin H, et al. Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus.* 2000. 9:664-671.

Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med.* 2003. 17;197(6):711-23.

Berry MP, Graham CM, McNab FW, Xu Z, Bloch SA, Oni T, et al. An interferon-inducible neutrophil-driven blood transcriptional signature in human tuberculosis. *Nature.* 2010. 466(7309):973-7.

Borden EC, Sen GC, Uze G, Silverman RH, Ransohoff RM, Foster GR, & Stark GR. *Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. Nature Reviews Drug Discover.* 2007. 6(12):975–990.

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

Costa PDSS, Fraga LR, Kowalski TW, Daxbacher ELR, Schuler-Faccini L, Vianna FSL. Erythema Nodosum Leprosum: Update and challenges on the treatment of a neglected condition. *Acta Trop.* 2018. 183:134-141

Cherie T, Mendoza JLK, Garcia CK, & Michael B.A. Oldstone. Alpha and Beta Type 1 Interferon Signaling: Passage for Diverse Biologic Outcomes. Elsevier. 2016. 2015:12.027.

Dias AA, Silva CO, Santos JP, Batista-Silva LR, Acosta CC, Fontes AN, et al. DNA sensing via TLR-9 constitutes a major innate immunity pathway activated during erythema nodosum leprosum. *J Immunol* (2016) 197(5):1905–13.

Fensterl V, Sen GC. Interferon-induced Ifit proteins: their role in viral pathogenesis. *J Virol*. 2015. 89:2462–2468.

Foss NT. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina, Ribeirão preto, Hnaseníase* 1997. 30: 355-339.

Gallo MEN, Alvin MFS, Nery JAC, Albuquerque ECA. Estudo comparativo com dois esquemas poliquimioterápicos (duração fixa) em hansenianos multibacilares – Seguimento de 50.32 ± 19.62 e 39.70 ± 19.47 meses. *Hansen Int*. 1997; 22:5-14.

Guiducci C, Coffman RL, & Barrat FJ. Signalling pathways leading to IFN- α production in human plasmacytoid dendritic cell and the possible use of agonists or antagonists of TLR7 and TLR9 in clinical indications. *Journal of Internal Medicine*. 2008. 265:43–57.

Gul E, Sayar EH, Gungor B, Eroglu FK, Surucu N, Keles S, et al. Type I IFN-related NETosis in ataxia telangiectasia and Artemis deficiency. *J Allergy Clin Immunol*. 2018. 142(1):246-257.

Hansen GA. Causes of leprosy. Translated by Pallamary P. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1955. 23:307-9.40(6):363-70.

Hilkens CM, Schlaak JF, & Kerr IM. Differential responses to IFN- α subtypes in human T cells and dendritic cells. *J Immunol*. 2003. 15;171(10):5255-63.

Horta-Baas G, Hernández-Cabrera MF, Barile-Fabris LA, Romero-Figueroa M del S, & Arenas-Guzmán R. Multibacillary leprosy mimicking systemic lupus erythematosus: case report and literature review. *Lupus*. 2015. 24:1095–1102.

Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL & Notkins AL. Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N. Engl. J. Med.* 1979. 301:5–8.

Isaacs A. & Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 1957. 147:258–267.

Ito T, Ando H, Suzuki T, Ogura T, Hotta K, Imamura Y, et al. Identification of a primary target of thalidomide teratogenicity. *Science*. 2010. 327(5971):1345-50.

Ito T, & Handa H. Cereblon and its downstream substrates as molecular targets of immunomodulatory drugs. *Int J Hematol*. 2016. 104:293–299.

Iyer A, Hatta M, Usman R, Luiten S, Oskam L, Faber W, et al. Serum levels of interferon-gamma, tumour necrosis factor-alpha, soluble interleukin-6R and soluble cell activation markers for monitoring response to treatment of leprosy reactions. *Clin Exp Immunol* (2007) 150(2):210–6.

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

Kahawita IP, Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An. Bras. Dermatol*. 2008. vol.83 no.1.

Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, MD, & Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *Journal American Academy of Dermatology* 2014. 71: 0190-9622.

Kioon MD, Tripodo C, Fernandez D, Kirou KA, Spiera RF, Crow MK, et al. Plasmacytoid dendritic cells promote systemic sclerosis with a key role for TLR8. *Sci Transl Med*. 2018. 10;10(423).

Kirchheimer W, & Storrs E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*, Linn) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr* 1971; 39:693-702.

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

Lastória JC, & Abreu MAMM. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol* 2014. 89(2): 205–218.

Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, et al. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis.* 2010. 15;201(4):558-69.

Legendre DP, Muzny CA, & Swiatlo E. Hansen's disease (Leprosy): current and future pharmacotherapy and treatment of disease-related immunologic reactions. *Pharmacotherapy.* 2012. (1):27-37.

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

Mahajan A, Herrmann M, & Muñoz LE. Clearance Deficiency and Cell Death Pathways: A Model for the Pathogenesis of SLE. *Front Immunol.* 2016. 8;7:35.

Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, et al. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001. 98(10):5752-7.

Manca C, Tsenova L, Freeman S, Barczak AK, Tovey M, Murray PJ, et al. Hypervirulent *M. tuberculosis* W/Beijing strains upregulate type I IFNs and increase expression of negative regulators of the Jak-Stat pathway. *J Interferon Cytokine Res.* 2005. 25(11):694-701.

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

Martinez AN, Britto CFPC, Nery JAC, Sampaio EP, Jardim MR, & Sarno EN. Evaluation of real-time and conventional PCR targeting complex 85 genes for detection of *Mycobacterium leprae* DNA in skin biopsy samples from patients diagnosed with leprosy. Journal of clinical microbiology 2006; 44(9):3154.

Millrine D, Miyata H, Tei M, Dubey P, Nyati K, Nakahama T, & et al. Immunomodulatory drugs inhibit TLR4-induced type-1 interferon production independently of Cereblon via suppression of the TRIF/IRF3 pathway. International Immunology. 2016. 28: 307–315.

Ministerio da saúde. Hanseníase: o que é, causas, sinais e sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. 2019. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hansenise#situacao>. Acesso em: 31 de agosto, de 2019.

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

Misch, EA. et al. Leprosy and the human genome. Microbiol Mol Biol Rev 2010. 74:1098-5557.

Moura RS, Calado KL, Oliveira MLW, & Bühner-Sékula S. Sorologia da hanseníase utilizando PGL-I: revisão sistemática. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 2008; 41(Sup II):11-8.

Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988. 85(4):1213-7.

Moraes MO, Sarno EN, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Martins RC, et al. Cytokine mRNA expression in leprosy: a possible role for interferon-gamma and interleukin-12 in reactions (RR and ENL). *Scand J Immunol* (1999) 50(5):541–9.

Moran CJ, Ryder G, Turk JL, & Waters MF. Evidence for circulating immunocomplexes in lepromatous leprosy. *Lancet*. 1972. 16;2(7777):572-3.

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinas A, Frindt P, Smith K A, & Kaplan G. Thalidomide exerts its inhibitory action on tumor necrosis factor alpha by enhancing mRNA degradation. *Journal experimental medicine*. 1993. 177 (6): 1675.

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

McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, & O'Garra A. Type I interferons in infectious disease. *Nature Reviews Immunology*. 2015. 10:1038-3787.

Nakano S, Morimoto S, Suzuki J, Nozawa K, Amano H, Tokano Y, et al. Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus. *Rheumatology (Oxford)*. 2008. 47(2):145-9.

Negera E, Bobosha K, Walker SL, Endale B, Howe R, Aseffa A, et al. New Insight into the Pathogenesis of Erythema Nodosum Leprosum: The Role of Activated Memory T-Cells. *Front Immunol*. 2017. 8:1149.

Negera E, Walker SL, Lema T, Aseffa A, Lockwood DN, & Dockrell HM. Complement C1q expression in Erythema nodosum leprosum. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018. 2:12(3):e0006321.

Negera E, Tilahun M, Bobosha K, Lambert SM, Walker SL, Spencer JS, et al. The effects of prednisolone treatment on serological responses and lipid profiles in Ethiopian leprosy patients with Erythema Nodosum Leprosum reactions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018. 28;12(12):e0007035.

Negera E, Walker SL, Bobosha K, Howe R, Aseffa A, Dockrell HM, et al. T-cell regulation in Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017. 9;11(10):e0006001.

Negera E, Walker SL, Bekele Y, Dockrell HM, Lockwood DN. Increased activated memory B-cells in the peripheral blood of patients with erythema nodosum leprosum reactions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017. 18;11(12):e0006121.

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

O'Connell RM, Saha SK, Vaidya SA, Bruhn KW, Miranda GA, Zarnegar B, et al. Type I interferon production enhances susceptibility to *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med*. 2004.16;200(4):437-45.

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

Opitz B, Vinzing M, Laak V, Schmeck B, Heine G, Günther S, et al. *Legionella pneumophila* induces IFNbeta in lung epithelial cells via IPS-1 and IRF3, which also control bacterial replication. *J Biol Chem*. 2006. 24;281(47):36173-9.

Ortaldo JR, Herberman RB, Harvey C, Osheroff P, Pan YC, Kelder B, et al. A species of human alpha interferon that lacks the ability to boost human natural killer activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984. 81(15):4926-9.

Parkash O, Kumar A, Pandey R, Nigam A, & Girdhar BK. Performance of a lateral flow test for the detection of leprosy patients in India. *J Med Microbiol*. 2008; 57:130-2.

Pestka S, Krause CD, & Walter MR. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*. 2004. 202:8–32.

Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg*. 2006. 74:868-79.

Polycarpou A, Walker SL, & Lockwood DNJ. A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. *Frontiers in Immunology*. 2017. 8:233.

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

Rodero PM, Decalf J, Bondet V, Hunt D, Rice I. G, Werneke S, et al. Detection of interferon alpha protein reveals differential levels and cellular sources in disease. *Journal of experimental medicine*. 2017.10.1084.

Rönblom L, & Pascual V The innate immune system in SLE: type I interferons and dendritic cells. *Lupus*. 2008.17(5): 394–399.

Sampaio EP, Sarno EN, Galilly R, Cohn ZA, & Kaplan G. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J Exp Med*. 1991. 173(3):699-703.

Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, & Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J Exp Med* (1992) 175(6):1729–37.

Sandler NG, Bosinger SE, Estes JD, Zhu RT, Tharp GK, Boritz E, et al. Type I interferon responses in rhesus macaques prevent SIV infection and slow disease progression. *Nature*. 2014. 31;511(7511):601-5.

Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, & Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* (1991) 84(1):103–8.

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

Schmitz V, Prata RBS, Barbosa MGM, Mendes MA, Brandão SS, Amadeu TP, et al. Expression of CD64 on Circulating Neutrophils Favoring Systemic Inflammatory Status in Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016. 10(8): e0004955.

Schmitz V, Tavares IF, Pignataro P, Machado AM, Pacheco FDS, Santos JB, et al. Neutrophils in Leprosy. *Front Immunol.* 2019. 10:495.

Shepard CC. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J Exp Med.* 1960. 1;112(3):445-54.

Shepard CC. Multiplication of *Mycobacterium leprae* in the foot-pad of the mouse. *Int J Lepr.* 1962. Sep;30:291–306.

Silva CO. Envolvimento da NETose na imunopatogênese do Eritema Nodoso Hanseniano. Dissertação de mestrado da pós graduação em biologia celular e molecular. Fiocruz, Rio de Janeiro. 2018.

Silva CO, Dias AA, Nery JAC, Machado AM, Ferreira H, Rodrigues TF, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of leprosy type 2 reactions. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019. 13(9): e0007368.

Silva PHL, Santos LN, Mendes MA, Nery JAC, Sarno EN, Esquenazi D. Involvement of TNF-Producing CD8+ Effector Memory T Cells with Immunopathogenesis of Erythema Nodosum Leprosum in Leprosy Patients. *Am J Trop Med Hyg.* 2019. 100(2):377-385.

Souza CS. Hanseníase: formas clínicas e diagnóstico diferencial. *Medicina, Ribeirão preto, Hanseníase.* 1997. 30: 325-334.

Sousa JR, Sotto MN, & Quaresma JAS. Leprosy as a Complex infection: Breakdown of the Th1 and Th2 immune Paradigm in the immunopathogenesis of the Disease. *Frontiers in immunology* 2017. 8:1635.

Suzuki K, Takigawa W, Tanigawa K, Nakamura K, Ishido Y, Kawashima A. *et al.* Detection of *Mycobacterium leprae* DNA from archaeological skeletal remains in Japan using whole genome amplification and polymerase chain reaction. *Plos One* 2010; 5(8): 12422.

Suzuki K, Akama T, Kawashima A, Yoshihara A, Yotsu R R, & Ishii N. Current status of leprosy: Epidemiology, basic science and clinical perspectives. *The journal of dermatology* 2012. 39: 121–129.

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

Teles RMB, Graeber TG, Krutzik SR, Montoya D, Schenk M, Lee DJ, *et al.* Type I interferon suppresses type II interferon-triggered human anti-mycobacterial responses. *Science*. 2013. 339(6126):1448–53.10.

Teles RMB, Kelly-Scumpia KM, Sarno EN, Rea TH, Ochoa MT, Cheng G, *et al.* IL-27 suppresses antimicrobial activity in human leprosy. *J Invest Dermatol*. 2015. 135(10):2410–7.10.

Toledo-Pinto TG, Ferreira ABR, Ribeiro-Alves M, Rodrigues LS, Batista-Silva LR, Silva BJ, *et al.* STING-dependent 2'-5' oligoadenylate synthetase-like production is required for intracellular *Mycobacterium leprae* survival. *J Infect Dis*. 2016. 214(2):311–20.

Truman RW, & Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent, *International journal of leprosy and other mycobacterial diseases* 2001; 69(1):1-12.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A. *et al.* Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. *New England Journal of Medicine*. 2011. 364(17): 1626–163.

Truman R. Leprosy in wild armadillos. *Lepr Rev.* 2005; 76(3):198-208.

Vieira LMM. Eritema nodoso leproso: alguns aspectos clínicos e imunológicos. Tese de doutorado apresentada ao curso de pós-graduação em medicina tropical. Fiocruz, Rio de Janeiro. 1991.

Virmond M, Grzybowski A, & Virmond L. Leprosy: A glossary. *Clinics in Dermatology* 2015. 33: 8–182.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2017: reducing the disease burden due to leprosy. **Weekly Epidemiological Record**, v. 93, n. 35, p. 445–456, 2018.

Wade HW. Demonstration of acid-fast bacilli in tissue sections. *Am J Pathol*, v. 28, n. 1, p. 157-70, 1952.

Walker SL, Balagão M, Darlong J, Doni SN, Hagge DA, & Halwai V. ENLISTA 1: Um estudo transversal multicêntrico internacional das características clínicas do Erythema Nodosum Leprosum. *PLoS Negl Trop Dis.* 2015. (9): e0004065.

Wemambu SN, Turk JL, Waters MF, & Rees RJ. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the arthus phenomenon. *Lancet.* 1969; 2(7627):933-5.

Waddell SJ, Popper SJ, Rubins KH, Griffiths MJ, Brown PO, Levin M, et al. Dissecting interferon-induced transcriptional programs in human peripheral blood cells. *PLoS One.* 2010. 22;5(3): e9753.

Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol.* 1992. 15;149(4):1470-5.

Yusof MY, Psarras A, El-Sherbiny YM, Hensor EMA, Dutton K, Ul-Hassan S, et al. Prediction of autoimmune connective tissue disease in an at-risk cohort: prognostic

value of a novel two-score system for interferon status. *Ann Rheum Dis.* 2018. 77(10):1432-1439.

Zhen A, Rezek V, Youn C, Lam B, Chang N, Rick J, et al. Targeting type I interferon-mediated activation restores immune function in chronic HIV infection. *J Clin Invest.* 2017. 3;127(1):260-268.

Wahadat MJ, Bodewes ILA, Maria NI, van Helden-Meeuwsen CG, van Dijk-Hummelman A, Steenwijk EC, et al. Type I IFN signature in childhood-onset systemic lupus erythematosus: a conspiracy of DNA- and RNA-sensing receptors?. *Arthritis Res Ther.* 2018. 10;20(1):4.

8. ANEXOS

8.1 Ficha da escala de severidade do ENH

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