

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

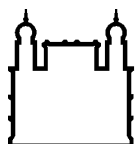
**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Mestrado em Biologia Celular e Molecular**

**ENVOLVIMENTO DA VIA IL- 10/IL-10R NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA  
DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO PELO *Mycobacterium leprae***

**FABIANA DOS SANTOS PACHECO**

**RIO DE JANEIRO**

Setembro/2019



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

FABIANA DOS SANTOS PACHECO

Envolvimento da via IL-10/IL-10R na resposta imunológica durante o curso da infecção pelo *Mycobacterium leprae*

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

**Orientador (as):** Dra. Euzenir Nunes Sarno  
Dra. Verônica Schmitz Pereira

**RIO DE JANEIRO**  
Setembro/2019

Dos Santos Pacheco, Fabiana .

ENVOLVIMENTO DA VIA IL-10/IL-10R NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO PELO MYCOBACTERIUM LEPRAE / Fabiana Dos Santos Pacheco. - Rio de Janeiro, 2019.

62 f.

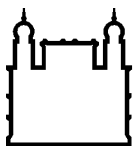
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

Orientadora: Euzenir Nunes Sarno .

Co-orientadora: Verônica Schmitz Pereira .

Bibliografia: f. 50-59

1. Hanseníase. 2. Eritema Nodoso Hansênico. 3. Neutrófilos . 4. IL-10. 5. IL-10R1. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**FABIANA DOS SANTOS PACHECO**

**ENVOLVIMENTO DA VIA IL-10/IL-10R NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA  
DURANTE O CURSO DA INFECÇÃO PELO *MYCOBACTERIUM LEPRAE***

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dra. Euzenir Nunes Sarno**  
**Prof. Dra. Verônica Schmitz Pereira**

**Aprovada em: \_\_\_03\_\_\_/\_\_\_12\_\_\_/\_\_\_2019\_\_\_**

**EXAMINADORES:**

Prof. Dra. Marcia de Berredo Pinho Moreira- Presidente (IOC – FIOCRUZ)

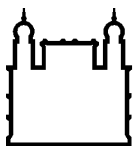
Prof. Dra. Flavia Lima Ribeiro Gomes (IOC – FIOCRUZ)

Prof. Dra. Thais Porto Amadeu (UERJ)

**SUPLENTE:**

Prof. Dr. Bruno De Siqueira Mietto (UFJF)

Rio de Janeiro, 03 de setembro de 2019



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular de **Fabiana dos Santos Pacheco**, sob orientação da Dr<sup>a</sup>. Euzenir Nunes Sarno e Dr<sup>a</sup>. Verônica Schmitz Pereira. Ao terceiro dia do mês de setembro de dois mil e dezenove, realizou-se às dez horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: “**Envolvimento da via IL-10/IL-10R na resposta imunológica durante o curso da infecção pelo *Mycobacterium leprae***”, 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<sup>a</sup>. Márcia de Berrêdo Pinho Moreira - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr<sup>a</sup>. Flávia Lima Ribeiro Gomes - IOC/FIOCRUZ, Dr<sup>a</sup>. Thais Porto Amadeu - UERJ/RJ e como suplentes: Dr. Bruno de Siqueira Mietto – UFJF/MG e Dr. Vinícius de Frias Carvalho – 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<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 03 de setembro de 2019.

Dr<sup>a</sup>. Márcia de Berrêdo Pinho Moreira (Presidente da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Flávia Lima Ribeiro Gomes (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Thais Porto Amadeu (Membro da Banca):

Dr<sup>a</sup>. Leila de Mendonça Lima (Coordenadora do Programa):

Aos meus pais por todo apoio e amor

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, pois sem Ele nada teria sido possível, já que através dele encontrei a força e determinação para que esse trabalho fosse possível.

Às minhas orientadoras Dra. Euzenir Nunes Sarnos e a Dra. Verônica Schmitz Pereira pela oportunidade, pelo apoio e todo aprendizado oferecidos por elas desde a iniciação científica. Agradeço imensamente a elas por toda paciência, conselhos e principalmente confiança para elaboração deste projeto. São exemplos para mim, serei eternamente grata por tudo;

Aos meus pais, Maria e Wilson (póstumas), sem eles nada disso teria sido possível, já que nunca mediram esforços para que diferente deles eu pudesse ter estudo e ter a liberdade para exercer a profissão da qual sempre sonhei. Obrigada por sempre acreditarem em mim e por todo carinho, educação e principalmente amor incondicional. Obrigada mãe, por ter se mantido forte mesmo quando meu pai não pode mais estar conosco, por me dar forças para continuar nos momentos mais difíceis, sem você eu não teria conseguido. E obrigada pai, por tudo!;

Às minhas amigas, Isabella Forasteiro, Thais Fernanda Rodrigues e Jéssica Brandão dos Santos, que estão comigo desde a faculdade e seguimos juntas nesse caminho da pesquisa. Obrigada meninas, por toda ajuda, apoio, risadas sem fim e principalmente pela amizade de vocês. Sem vocês eu tenho certeza que esse caminho teria sido mais difícil do que já é.

Ao meu namorado Henrique, com quem eu sempre posso contar independente da situação. Obrigada por não me deixar desistir, por ouvir minhas prévias de apresentações mesmo sem entender nada e principalmente por me amar;

Aos amigos do Pavilhão de Hanseníase por toda ajuda desde a iniciação científica, por sempre estarem dispostos a me ajudar e tirar minhas dúvidas durante todo esse processo, pelas risadas garantidas;

Aos funcionários: Michele, Joel, Augusto, Solange, Seu Paulo, e Seu Salles (póstumas) pela disponibilidade e por toda ajuda;

À toda equipe do ambulatório Souza Araújo, e especial ao Dr. José Augusto, pelo recrutamento dos pacientes e por sempre estar disposto a ensinar sobre hanseníase e sobre as reações hansênicas;

Aos pacientes de hanseníase. Sem vocês este trabalho não teria sido possível. Obrigada e este trabalho é por vocês;

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela excelência das aulas e ensinamentos;

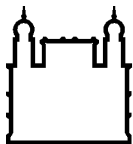
Às tecnologistas da plataforma de citometria, Daniela Beghini e Cynthia Machado por toda ajuda na parte de citometria e por sempre estarem dispostas a me ajudar;

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;

Obrigada a todos que me ajudarem de forma direta ou indireta para que este trabalho fosse possível, sem vocês eu não teria conseguido.



“A maior recompensa para o trabalho do homem não é o que se ganha, mas o que ele nos torna.” John Ruskin



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

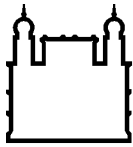
### **Envolvimento da via IL-10/IL-10R na resposta imunológica durante o curso da infecção pelo *Mycobacterium leprae***

#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**Fabiana dos Santos Pacheco**

A interleucina-10 (IL-10) possui papel chave no controle das respostas inflamatórias. A atividade biológica da IL-10 é mediada pela ligação da IL-10 com o receptor heterodimérico composto pelas cadeias IL-10R1 e IL-10R2. Estudos anteriores demonstram que neutrófilos circulantes de doadores sadios expressam constitutivamente a cadeia IL-10R2, porém não expressam IL-10R1, e dessa forma não respondem a IL-10 *in vitro*. A expressão das duas cadeias é essencial para a responsividade a IL-10. Neutrófilos circulantes de pacientes sépticos expressam o receptor IL-10R1 e essa expressão é corroborada com a responsividade à IL-10. O eritema nodoso hansênico (ENH) é uma complicação imunológica grave da hanseníase multibacilar que apresenta aspectos semelhantes à sepse, como leucocitose neutrofílica, febre, mal-estar e inflamação sistêmica. O ENH altera o curso crônico da hanseníase, pois acelera os danos nos nervos periféricos, resultando em incapacidades físicas permanentes. Um dos aspectos marcantes desta reação é a presença de neutrófilos na derme profunda e no tecido subcutâneo nas lesões. Dessa forma, o ENH tem sido caracterizado como uma condição imunomediada por neutrófilos. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial da via da IL-10 na regulação da produção de citocinas produzidas por neutrófilos durante o episódio de ENH. Nesse estudo, reportamos que neutrófilos de sangue periférico de pacientes acometidos pelo ENH expressam altos níveis de IL-10R1. Além disso, demonstramos que esses mesmos pacientes, quando tratados com a talidomida, possuem níveis ainda mais elevados de IL-10R1 na superfície de neutrófilos circulantes. Observamos também que neutrófilos presentes nas lesões de pele de pacientes acometidos pelo ENH expressam IL-10R1. Ensaios *ex vivo* revelaram que a IL-10 foi capaz de inibir a produção espontânea de TNF de neutrófilos de pacientes com ENH, e induzir a produção de TGF- $\beta$ 1. Por outro lado, neutrófilos de pacientes controle não-reacionais não produzem espontaneamente TNF, porém, assim como neutrófilos de pacientes com ENH, produzem TGF- $\beta$ 1. Em seguida, demonstramos que o *M. leprae* foi capaz de induzir a produção de IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1 $\beta$ /CCL4, TGF- $\beta$  e IL-1RA em neutrófilos de doadores sadios *in vitro*, e que a adição de IL-10 reduziu a produção dessas citocinas, com exceção de TGF- $\beta$ 1 que aumentou. Nossas conclusões demonstraram a capacidade do *M. leprae* em induzir a expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos sadios. Coletivamente, nossos dados confirmam que neutrófilos participam da inflamação sistêmica associada ao ENH por meio da produção de citocinas. Esses resultados contribuem para o melhor entendimento dos mecanismos patogênicos e apontam para a via da IL-10 como alvo molecular terapêutico e diagnóstico.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Involvement of IL-10/IL-10R Pathway in immunological responses during the infection of *Mycobacterium leprae***

#### **MASTER DISSERTATION IN CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY**

**Fabiana dos Santos Pacheco**

Interleukin-10 (IL-10) plays a key role in controlling inflammatory responses. The biological activity of IL-10 is mediated through ligation of IL-10 and the heterodimeric receptor composed of the IL-10R1 and IL-10R2 chains. Previous studies demonstrate that circulating neutrophils from healthy donors constitutively express the IL-10R2 chain, but do not express IL-10R1, and thus do not respond to IL-10 in vitro. Expression of the two chains is essential for IL-10 responsiveness. Circulating neutrophils from septic patients express the IL-10R1 receptor and this expression is corroborated with responsiveness to IL-10. Erythema nodosum Leprosum (ENL) is a serious immunological complication of multibacillary leprosy with similar aspects to sepsis, such as neutrophilic leukocytosis, fever, malaise and systemic inflammation. ENL alters the chronic course of leprosy as it accelerates peripheral nerve damage, resulting in permanent physical disabilities. One of the striking features of this reaction is the presence of neutrophils in the deep dermis and subcutaneous in tissue lesions. Thus, ENL has been characterized as a neutrophil-mediated condition. The aim of this study was to investigate the potential of the IL-10 pathway in regulating the production of neutrophil-produced cytokines during the ENL episode. In this study, we reported that peripheral blood neutrophils from patients with ENL express high levels of IL-10R1. Furthermore, we demonstrated that these same patients, when treated with thalidomide, have even higher levels of IL-10R1 on the surface of circulating neutrophils. We also observed that neutrophils present in the skin lesions of patients affected by ENL express IL-10R1. Ex vivo assays revealed that IL-10 was able to inhibit spontaneous neutrophil TNF production from patients with ENL, and induce TGF- $\beta$  production. On the other hand, neutrophils from nonreactive control patients do not spontaneously produce TNF, but, like neutrophils from patients with ENL, they produce TGF- $\beta$ 1. We then demonstrated that *M. leprae* was able to induce IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1 $\beta$  / CCL4, TGF- $\beta$ 1 and IL-1RA production in healthy donor neutrophils in vitro, and the addition of IL-10 reduced the production of these cytokines, with the exception of TGF- $\beta$ 1 which increased. In conclusion we demonstrate the ability of *M. leprae* to induce IL-10R1 expression on the surface of healthy neutrophils. Collectively, our data confirm that neutrophils participate in ENL-associated systemic inflammation through cytokine production. These results contribute to a better understanding of pathogenic mechanisms and point to the IL-10 pathway as a therapeutic and diagnostic molecular target.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1. Hanseníase .....</b>	<b>1</b>
1.1 Características Gerais .....	1
1.2 Agente Etiológico .....	2
1.3 Transmissão .....	5
1.4 Diagnóstico .....	5
1.5 Classificações e formas clínicas .....	6
1.6 Tratamento .....	10
1.7 Aspectos imunológicos gerais .....	11
1.8 Episódios reacionais .....	13
1.8.1 Reação Reversa ou reação tipo 1 .....	13
1.8.2 Eritema Nodoso Hansênico ou reação tipo 2 .....	15
1.8.2.1 Neutrófilos no Eritema Nodoso Hansênico .....	17
1.9 Via IL-10/IL-10R .....	19
<b>1.10 Justificativa .....</b>	<b>22</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1 Pacientes e doadores sadios voluntários .....	25
3.2 Coleta de sangue e purificação de neutrófilos .....	25
3.3 Análise do grau de pureza da amostras.....	26
3.4 Cultura de neutrófilos .....	27
3.5 Expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos.....	27
3.6 Ensaio imunoenzimático .....	28
3.7 Imunofluorescência .....	28
3.8 Análises estatísticas .....	29

<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
4.1	Estabelecimento de coorte de pacientes .....	30
4.2	Análise do grau de pureza da purificação de neutrófilos circulantes do sangue periférico .....	31
4.3	Expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos de pacientes com ENH .....	32
4.4	Expressão de IL-10R1 em neutrófilos de lesão de pacientes com ENH .....	34
4.5	Efeito da talidomida na expressão de IL-10R1 em neutrófilos ENH e nos níveis séricos de IL-10 .....	35
4.6	IL-10 modula a produção de espontânea de citocinas em neutrófilos ENH .....	36
4.7	Produção de citocinas e quimiocinas em neutrófilos de doadores sadios estimulados com <i>M. leprae</i> .....	38
4.8	IL-10 modula a produção de citocinas e quimiocinas induzidas pelo <i>M. leprae</i> em neutrófilos .....	39
4.9	<i>M. leprae</i> induz a expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos sadios .....	41
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>49</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>APÊNDICES E/OU ANEXOS .....</b>	<b>60</b>
<b>7.1.</b>	<b>Termo de consentimento livre e esclarecido pacientes .....</b>	<b>60</b>
<b>7.2</b>	<b>Termo de consentimento livre e esclarecido de doadores sadios .....</b>	<b>61</b>
<b>7.3</b>	<b>Comissão nacional de ética em pesquisa .....</b>	<b>62</b>

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição geográfica dos casos de hanseníase no ano de 2017.....	2
FIGURA 2: Cultivo de <i>M leprae</i> na pata de camundongo .....	3
FIGURA 3: Aspectos morfológicos do <i>mycobacterium leprae</i> .....	4
FIGURA 4: Evolução natural da hanseníase .....	6
FIGURA 5 : Espectro de formas clínicas da hanseníase .....	7
FIGURA 6: Aspecto de lesão cutânea de paciente com hanseníase tuberculóide .....	8
FIGURA 7: Pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase .....	9
FIGURA 8: Resposta imunológica da hanseníase de acordo com os pólos da hanseníase.....	12
FIGURA 9: Paciente com reação reversa ou reação tipo 1 .....	14
FIGURA 10: Eritema Nodoso Hansênico (ENH). .....	15
FIGURA 11: Cortes histológicos de lesão de pele de pacientes com ENH.....	18
FIGURA 12: Representação esquemática da ligação da IL-10 e seu receptor heterodimérico .....	20
FIGURA 13: Responsividade de neutrófilos a IL-10 é dependente da expressão do receptor IL-10R1. ....	21
FIGURA 14 Análise de grau de pureza de neutrófilos purificados:.....	32
FIGURA 15: Expressão de IL-10R1 na superfície neutrófilos circulantes de pacientes ENH.....	33

FIGURA 16 : Expressão de IL-10R1 em neutrófilos de lesão de pacientes ENH .....	34
FIGURA 17: Expressão de IL-10R1 em neutrófilos circulantes de pacientes ENH durante tratamento com a talidomida e efeito da talidomida nos níveis séricos de IL-10.....	36
FIGURA 18: Efeito da IL-10 na produção espontânea de TNF, IL-1 $\beta$ e TGF $\beta$ -1 em culturas de neutrófilos.. .....	37
FIGURA 19: Produção de IL-8, IL-1B, IL-6, MIP1-B (CCL4), IL-1RA E TGFB-1 em neutrófilos de doadores sadios estimulados com <i>M. leprae</i> .....	39
FIGURA 20: Efeito da IL-10 na produção de IL-8, MIP1-B, IL-6, IL-1B, IL-1RA E TGFB-1 em culturas de neutrófilos estimuladas com <i>M. leprae</i> .....	40
FIGURA 21: <i>M. leprae</i> induz a expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos de doadores sadios.....	42

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Esquema terapêutico determinado pela oms conforme a forma clínica do paciente.....	10
TABELA 2: Dados demográficos e clínicos dos pacientes e voluntários incluídos no estudo.....	30



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>BAAR</b>	Bacilo álcool-ácido resistente
<b>BB</b>	<i>Borderline-borderline</i>
<b>BL</b>	<i>Borderline-lepromatoso</i>
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina
<b>BT</b>	<i>Borderline-tuberculoide</i>
<b>CD</b>	<i>Cluster</i> de diferenciação
<b>DAMPS</b>	Danos moleculares associados ao patógeno
<b>D.O.</b>	Densidade óptica
<b>ENH</b>	Eritema nodoso hanseniano
<b>ELISA</b>	Ensaio imunoenzimático
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína
<b>FSC</b>	Dispersão frontal da luz( <i>Forward Scatter</i> )
<b>FSC-A</b>	Dispersão frontal da luz que mede a área( <i>Forward Scatter-Area</i> )
<b>FSC-H</b>	Dispersão frontal da luz que mede a altura( <i>Forward Scatter- Height</i> )
<b>IB</b>	Índice baciloscópio
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>ILB</b>	Índice logarítmico da biópsia
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>LAM</b>	Lipoarabinomanana
<b>LL</b>	Forma polar lepromatosa
<b>LM</b>	Lipomanana
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>M</b>	Molar
<b>MB</b>	Multibacilar
<b>MFI</b>	Mediana de fluorescência
<b>mg</b>	Miligrama
<b><math>\mu</math>L</b>	Microlitro

<b>mL</b>	Mililitro
<b><i>M. leprae</i></b>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<b>μM</b>	Micromolar
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MPO</b>	Mieloperoxidase
<b>NGS</b>	Soro normal de cabra
<b>Nm</b>	Nanometro
<b>ON</b>	<i>Overnight</i>
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PAMP</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PBMC</b>	Células mononucleares de sangue periférico
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato
<b>PDIM</b>	Dimicocerosato de fitoceryl
<b>PIMs</b>	Fosfatidilinositol manosídeos
<b>PGL1-</b>	Glicolípido fenólico 1
<b>PQT</b>	Poliqumioterapia
<b>PRR</b>	Receptor de reconhecimento de padrões
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>PTX3</b>	Pentraxina
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RPM</b>	Rotação por minuto
<b>RR</b>	Reação reversa
<b>SBD</b>	Sociedade Brasileira de Dermatologia
<b>SBH</b>	Sociedade Brasileira de Hansenologia
<b>SSC</b>	Dispersão lateral da luz ( <i>Side Scatter</i> )
<b>TLRs</b>	Receptores a <i>Toll like receptors</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TT</b>	Forma polar tuberculoide
<b>WHO</b>	Organização Mundial de saúde ( <i>World Health Organization</i> )
<b>HO-1</b>	Heme oxigenase
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>CHX</b>	Cicloheximida



# INTRODUÇÃO

## 1. Hanseníase

### 1.1 Considerações Gerais

A hanseníase é uma doença crônica infectocontagiosa, conhecida desde os tempos bíblicos como lepra, que tem como agente etiológico o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). A doença afeta primeiramente a pele e nervos periféricos, ocasionando danos neurais como a degeneração do axônio e desmielinização, conseqüentemente causando perda da sensibilidade e paralisia, que evoluem para deformações e incapacidades físicas permanentes (Scollard *et al.*, 2006), sendo uma das doenças mais antigas descritas.

Acredita-se que a hanseníase tenha se originado na África Oriental e no Oriente Médio, e devido ao movimento migratório humano, a doença alcançou outros territórios (Monot *et al.*, 2005). Nas Américas a hanseníase chegou entre os séculos XVI e XVII com os colonizadores, e a disseminação da doença foi devido ao tráfico de escravos (Departamento Nacional de Saúde, 1960).

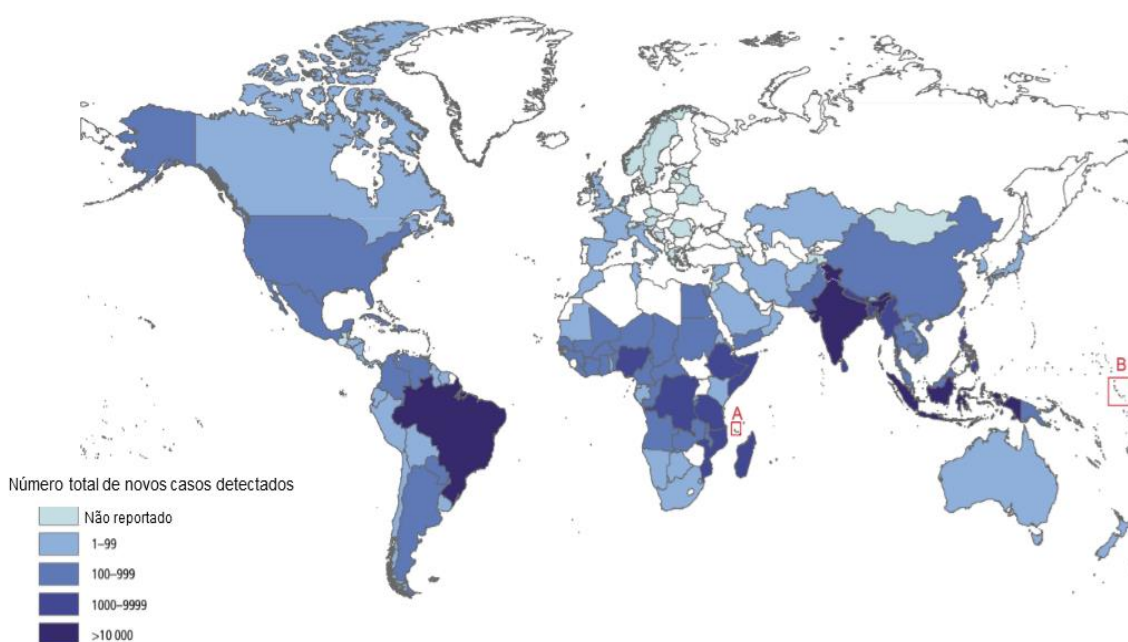
No Brasil, o surgimento se deu pela chegada dos colonizadores portugueses, os primeiros casos foram relatados em 1600, no Rio de Janeiro (Garcia.,2001). Mais tarde, em 1920, foi criado no Brasil o departamento nacional de saúde pública com objetivo de estabelecer medidas para controle da doença, através da construção de leprosários (EIDT., 2004). Em 1976, devido ao estigma e preconceitos associados ao termo lepra, houve uma mudança do termo para hanseníase no Brasil (Rotberg.,1997).

Atualmente, em relação ao perfil epidemiológico da hanseníase, em 2017 um levantamento feito pela Organização Mundial da Saúde (OMS) notificou 210.671 novos casos de hanseníase em 150 países, os países que apresentaram alta carga da doença foram: Índia, Brasil e Indonésia, sendo estes responsáveis por 80,2% da carga global de 2017 (Figura 1). Análises realizadas entre os anos 2008 e 2017 mostram uma redução na detecção de novos casos globais, de 249.007 em 2008 para 210.671 em 2017 (WHO., 2018).

Em relação ao Brasil, análises do Ministério da Saúde demonstraram um aumento no número de casos entre os anos de 2016 e 2017. Em 2016 foram notificados 25.218 novos casos, já em 2017, 26.875 novos casos, um aumento de 1.657 casos.

O Brasil é responsável por 92,2% dos casos de hanseníase nas Américas (Ministério da Saúde.,2018). Visando o controle da doença foi criada pela a OMS a “Estratégia Global da Hanseníase de 2016-2020: acelerando o desenvolvimento de um mundo sem hanseníase”, e essa estratégia foi adotada por grande parte dos países onde a hanseníase é endêmica, através de 3 pilares: (i) fortalecer a apropriação, coordenação e parcerias do governo; (ii) interromper a lepra e suas complicações; e (iii) interromper a discriminação e promover a inclusão (WHO.,2016).

Distribuição geográfica de novos casos de hanseníase, 2017



**Figura 1: Distribuição geográfica dos casos de hanseníase no ano de 2017.** Mapa representativo de novos casos de hanseníase dectados mundialmente no ano de 2017

Fonte: WHO.,2018. Adaptado pela autora Fabiana dos Santos Pacheco.

## 1.2 Agente etiológico

O *M. leprae* foi descoberto pelo médico norueguês Gerhard Armauer Hansen em 1873. Gerhard identificou a presença de microorganismos causadores da doença em amostras de pele de pacientes com hanseníase. Sua descoberta foi divulgada em 1874, sendo reconhecida internacionalmente em 1880 (Vogelsang, 1978). Apesar de ter sido descoberto ainda no século XIX, o *M. leprae* não é cultivável *in vitro* em meio axênico.

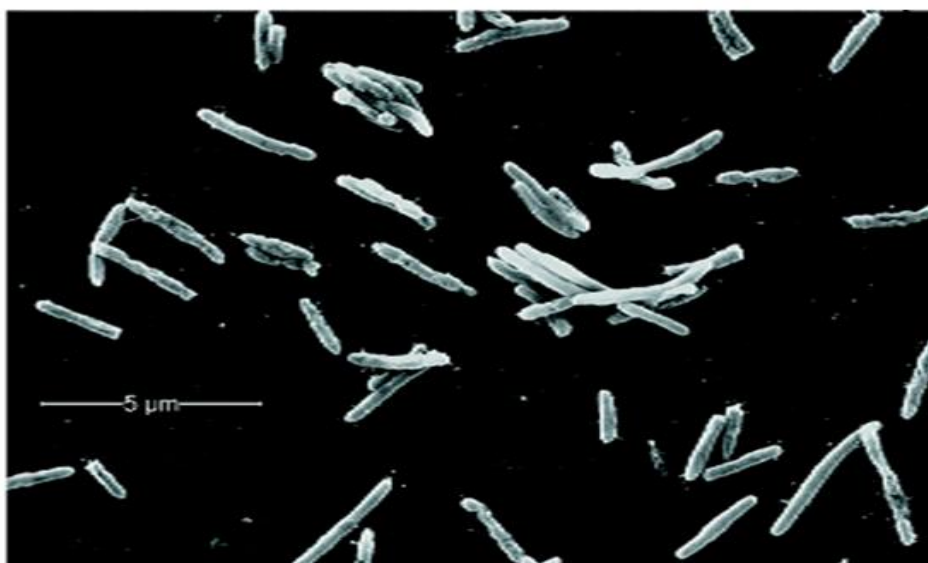
Devido à impossibilidade do cultivo *in vitro*, como alternativa tentaram cultivar o *M. leprae* em modelos animais. Tatus e camundongos atímicos foram os únicos animais dos quais obtiveram sucesso. A primeira inoculação em camundongos foi feita em 1960 por Charles C. Shepard. O bacilo foi inoculado no coxim plantar de camundongos BALB/c, sendo observada uma modesta multiplicação do bacilo. O modelo de Shepard foi importante para os avanços nos estudos *in vitro* e *in vivo* sobre a hanseníase, porém este modelo é limitado para a obtenção de grandes quantidades de bacilo (Shepard CC.,1962).Atualmente, os camundongos utilizados para multiplicação dos bacilos são os *nu/atímicos* que carecem de células B e T, sendo utilizado por diversos grupos de pesquisa para a obtenção dos bacilos de grandes quantidades de bactérias viáveis para estudos *in vitro*. Conforme mostrado na figura 2, o *M. leprae* foi inoculado no coxim plantar, observa-se a pata edemaciada devido ao intenso crescimento de bacilos. (Figura 2) (Costoln., 1976; Truman.,2001).

Em relação ao modelo animal, em 1971 Kirchheimer e Storrs infectaram tatus e foi observado comprometimento de pele, nervos periféricos, medula óssea, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos. Sendo o único animal capaz de desenvolver os sintomas observados em humanos (Kirchheimer & Storrs,1971). Além dos Tatus na américas, os esquilos vermelhos no reino unido são reservatórios naturais do bacilo (Avanzi *et al.*,2016). Apesar disto a cadeia de transmissão da hanseníase ainda não está clara.



**Figura 2: Cultivo de *M. leprae* na pata de camundongo.** Coxim plantar edemaciado de camundongo nude seis meses após a inoculação com *M. leprae*. Fonte: Scollard *et al* 2006.

Sendo o primeiro agente etiológico de uma doença humana a ser identificado. Apresenta-se na forma de bastonete reto ou ligeiramente encurvado com extremidades arredondadas (Figura 3) (Hussain., 2007). O *M. leprae* é classificado como bacilo álcool ácido resistente (BAAR), sendo corado com fuscina, pois não se decora pela lavagem com solução álcool/ácido. Nos cortes histológicos de lesões de pele os bacilos são vistos de forma isolada, em agrupamentos ou em grupo denominados globias, onde os bacilos unem-se de forma organizada levando a formação de uma substância incolor denominada “gléia” (Ress.,1994).



**Figura 3: Aspectos morfológicos do *Mycobacterium leprae*.** Imagem de microscopia eletrônica de varredura realizada a partir de cultivo do micobacterium no coxim plantar de camundongo, demonstrando as características morfológicas apresentadas pelo *M. leprae*. Fonte: Scollard *et al.*,2006.

O bacilo possui de 1 a 8 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro, é imóvel. A reprodução é lenta, com duração de aproximadamente 11-13 dias, o processo ocorre por divisão binária (Hansen.,1955; Scollard *et al.*,2006). Em relação à morfologia, o bacilo possui membrana plasmática, parede celular e uma camada mais externa denominada cápsula.

A parede celular do *M. leprae* é composta por peptideoglicanos ligados de forma covalente a ácidos arabinogalactanos que sustentam ácidos micólicos e Lipoarabinomana (LAM). A cápsula é composta por diversos lipídeos, sendo o glicolípídeo fenólico-1 (PGL-1) e o Ftiocerol dimicocerosato (PDIM) observados no *M. leprae* (Lastória & Abreu.,2014).

### 1.3 Transmissão

A via de transmissão da doença ainda não está clara. Estudos apontam o contato prolongado com pacientes multibacilares como um fator de risco para a transmissão da doença (Bratschi *et al.*,2015). Uma hipótese baseia-se no pressuposto que a doença seja transmitida pelo trato respiratório, pois foi detectada a presença do *M. leprae* na forma viável na mucosa nasal (Eichelmann K *et al.*, 2013).

Estudos reforçam a hipótese de que a transmissão ocorra pelas vias respiratórias, como a presença de adesinas na superfície do *M. leprae*. Adesinas como hemaglutinina ligadora de heparina e proteína histona-like, que poderiam se ligar em células epiteliais alveolares e nasais (Lima *et al.*,2009). Além disso, outros estudos demonstraram que o genoma do *M. leprae* contém o gene *mce1A* e o produto desse gene pode mediar a entrada do bacilo em células epiteliais respiratórias (Sato *et al.*,2007).

Acredita-se que indivíduos que foram infectados que desenvolveram ou não a doença podem apresentar um período transicional de liberação de bacilos, pois estudos demonstram a detecção de seqüências de DNA específicas do *M. leprae* em swabs e biópsias nasais (Neuman *et al.*,2017). Além disso, também foi observada a soropositividade para antígenos do bacilo em indivíduos saudáveis que residem em áreas endêmicas. Desta forma, considera-se que a transmissão ocorra predominantemente a partir das vias aéreas de um indivíduo infectado para um indivíduo susceptível (Lastória & Abreu, 2014).

Apesar destes fatores, grande parte dos indivíduos que entram em contato com o bacilo não desenvolve a doença. A susceptibilidade ao *M. leprae* possui influência genética, por isso familiares de pessoas com a doença apresentam maior chance de desenvolver a mesma (Ministério da Saúde.,2017).

### 1.4 Diagnóstico

A hanseníase pode afetar pessoas de qualquer faixa etária e sexo, o diagnóstico precoce é fundamental para evitar a evolução da doença, que ocorre de forma lenta e progressiva (Figura 4). O diagnóstico inicial da hanseníase é realizado por critérios clínicos, é observada a presença de sinais e sintomas característicos da doença, como alterações na pele acompanhadas ou não de perda de sensibilidade térmica, tátil e dolorosa e/ou alterações dos nervos periféricos (sensitivo e/ou motor) (Ministério da Saúde., 2017).



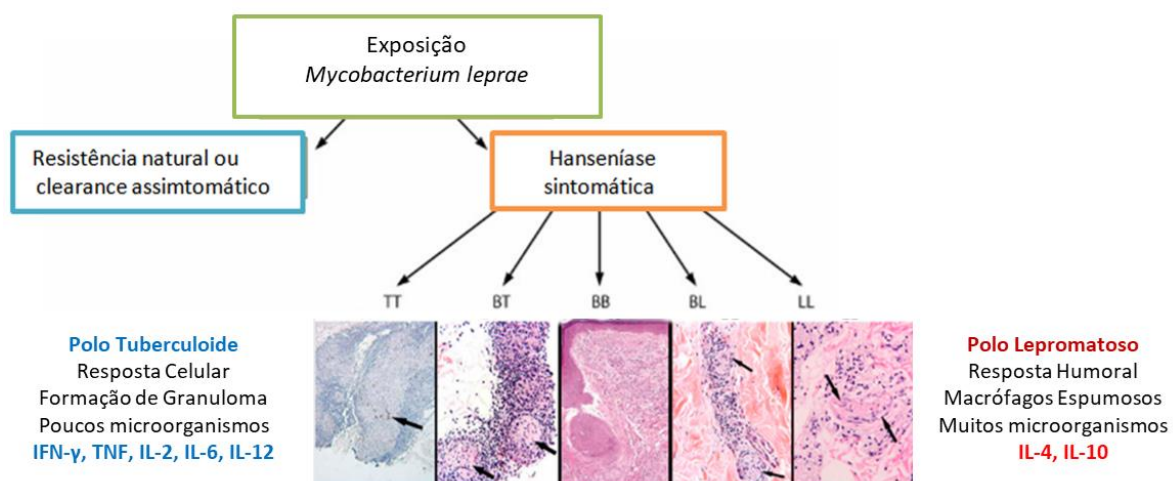
Só há confirmação do diagnóstico se houver encontro do agente etiológico, nos esfregaços cutâneos ou cortes histológicos de lesão de pele por procedimento de biópsia (Souza.,1997). “A biópsia de lesão de pele e a presença de bacilos do *M. leprae* dentro dos nervos são considerados “padrão-ouro” para confirmação de diagnóstico (Scollard *et al.*,2016). Na rede pública, os pacientes são diagnosticados somente pelo exame clínico da pele e do sistema nervoso periférico. Outro parâmetro analisado é a avaliação do número de lesões que permite analisar se o paciente é paucibacilar ou multibacilar (Mendonça *et al.*,2008).



**Figura 4: Evolução natural da hanseníase:** Fase inicial da doença e sua evolução lenta e progressiva ao longo dos anos. Paciente diagnosticada antes da era dos antibióticos e da utilização da Polioquimioterapia (PQT). Fonte: Ministério da Saúde.,2017

### 1.5 Classificações e formas clínicas da hanseníase

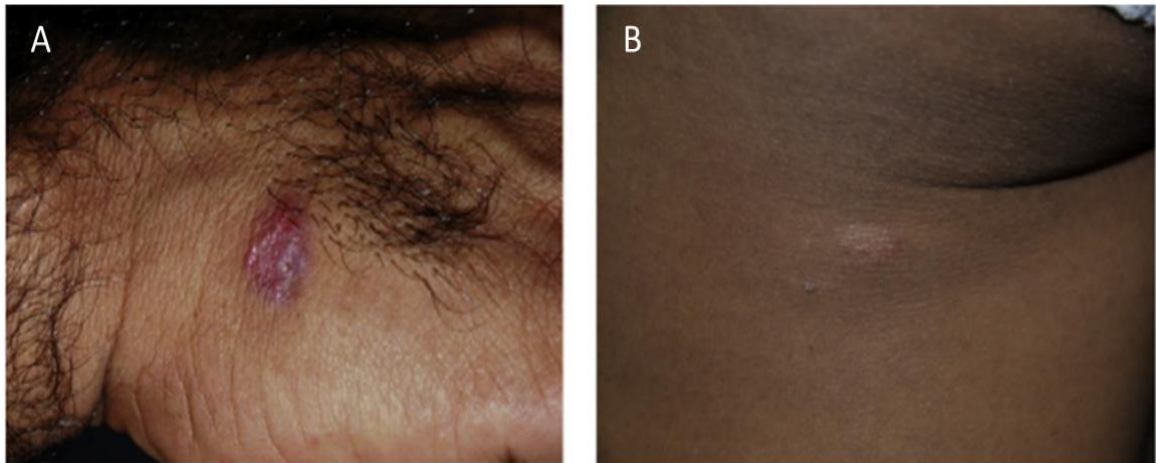
Segundo Ridley & Jopling (1966), os pacientes são classificados em um espectro que obedece a critérios clínicos, bacteriológicos, imunológicos, com ênfase nos histopatológicos. O espectro de classificação varia entre as formas de hanseníase tuberculoide-tuberculoide (TT) passando pelas formas *boderlines* (BT, BB e BL), indo até a forma de hanseníase lepromatosa-lepromatosa (LL) (Figura 5). As manifestações clínicas apresentam características distintas e o desenvolvimento da doença é dependente de mecanismos imunológicos do hospedeiro (Ridley & Jopling.,1966).



**Figura 5: Espectro de formas clínicas da hanseníase:** Manifestações da doença são classificadas em um espectro clínico. Indivíduos que entram em contato com o *M. leprae* podem apresentar resistência natural ou serem assintomáticos. Os que desenvolvem a doença podem desenvolver diferentes formas clínicas. O polo tuberculoide (TT), a resposta imune celular com produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF, IL-2, IL-6 e IL-12, formação de granulomas e presença de poucos microorganismos. No pólo denominado lepromatoso (LL), ocorre resposta imune humoral com produção de IL-4 e IL-10, presença de macrófagos espumosos e alta carga bacilar. Entre essas formas da doença, existem as *borderlines* (BT, BB e BL), que se caracterizam pela proximidade entre os pólos. Adaptado: Misch *et al.*, 2010. (Elaborado pela autora Fabiana dos Santos Pacheco).

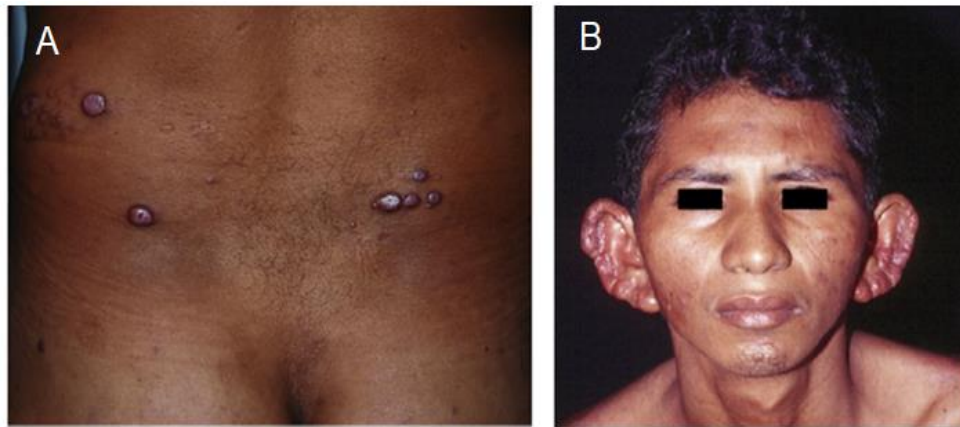
O polo tuberculoide é considerado o polo de resistência dentro do espectro da hanseníase, pois a resposta imune celular gerada pelo hospedeiro é eficaz contra o bacilo, resultando na contenção da carga bacilar. O perfil de resposta celular é predominantemente do tipo Th1. Neste polo raramente são detectados bacilos em biópsias de pele, apresentando baciloscopia negativa (Eichelmann *et al.*, 2013).

Em relação aos achados clínicos, os pacientes apresentam poucas lesões de pele, com bordas elevadas e bem definidas (Figura 6). Os danos neurais evoluem rapidamente, o que resulta em alterações na perda de sensibilidade com diminuição ou ausência de pelos. Além disso, os pacientes podem apresentar somente comprometimento neural, sem lesões cutâneas, sendo denominado de hanseníase tuberculoide neural pura (Souza., 1997).



**Figura 6: Aspecto de lesão cutânea de paciente com hanseníase tuberculoide.** O polo tuberculoide é clinicamente caracterizado pela presença de lesão única ou poucas lesões. Os pacientes também podem apresentar máculas eritematosas ou acobreadas, variando de acordo com a cor da pele do paciente. E também podem ser homegeneamente hipopigmentadas. (A) Imagem representativa de paciente com lesão única, apresentando bordas bem definidas e elevadas na mão. (B) Paciente apresentando mácula única com coloração hipopigmentada. Fonte: Talhari *et al.*,2015.

No outro extremo do espectro encontra-se o polo lepromatoso, forma clínica de suscetibilidade ao bacilo que resulta na multiplicação e disseminação da doença (Souza.,1997). Caracterizado pelo surgimento de inúmeras lesões no corpo e presença de bacilos nos nervos. Ocorre predomínio da resposta celular Th2 e exacerbada resposta imune humoral, onde há produção de anticorpos que não são protetores contra o bacilo (Eichelmann *et al.*,2013). Os pacientes podem apresentar lesões hipocrômicas ou eritematosas simetricamente e amplamente distribuídas. Sem tratamento, a infiltração é disseminada e o eritema progressivo, outras características também podem ser observadas nos pacientes com hanseníase lepromatosa como observadas na figura abaixo. (Figura 7) (Talhari *et al.*,2015).



**Figura 7: Pacientes com a forma lepromatosa da hanseníase.** Pacientes com hanseníase lepromatosa apresentam características como surgimento de lesões nodulares e envolvimento dos pavilhões auriculares. (A) Imagem representativa de paciente com hanseníase lepromatosa com lesões nodulares apresentando bordas bem definidas e superfície brilhante e lisa. (A) infiltração difusa do rosto com envolvimento bilateral de pavilhões auriculares. Fonte: Talhari *et al* .,2015.

Em 1982 a OMS propôs uma classificação mais simplificada e operacional, relacionada com a carga bacilar e o número de lesões. Classificando os pacientes multibacilares (MB) como os que possuem uma alta carga bacilar, baciloscopia positiva, múltiplas lesões com distribuição simétrica, múltiplos nervos comprometidos. Já os paucibacilares (PB), os que apresentam uma baixa carga bacilar, baciloscopia negativa, com única ou até 5 lesões de tamanhos variáveis, distribuição assimétrica, e pouco comprometimento neural (WHO.,1982).

Devido a dificuldades que alguns locais de atendimento apresentam na realização da baciloscopia, a OMS adotou uma forma de classificação que se baseia em critérios clínicos ao invés da carga bacilar. Classificando os PB como os que apresentam até cinco lesões cutâneas e em MB os pacientes que apresentam acima de cinco lesões (WHO.,1998).

## 1.6 Tratamento

Os pacientes diagnosticados com hanseníase iniciam o tratamento com uso de poliquimioterapia específica, resultando na supressão dos surtos reacionais, prevenção de incapacidades físicas, reabilitação física e psicossocial. O tratamento é oferecido por serviços de saúde da rede pública. Em casos de maior complexidade o atendimento é realizado em centros de referência locais, regionais ou nacionais (Araújo.,2003). Em 1981, a OMS introduziu o uso da poliquimioterapia de administração oral, com rifampicina, clofazimina e dapsona e essa combinação de fármacos se revelou muito eficaz para o controle da doença (tabela 1) (Aguas.,2008).

O tratamento é direcionado de acordo com as classificações clínicas, paucibacilar e multibacilar. Os tratamentos se diferem em relação à combinação de medicamentos e o período de duração do tratamento com objetivo de curar os pacientes e prevenir a cadeia de transmissão. Em regiões endêmicas o tratamento é feito de forma supervisionada e posteriormente documentada (Fisher *et al.*,2017).

Apresentação	Mensalmente	Diariamente	Duração
Paucibacilar (PB)	Rifampicina 600mg	Dapsona 100mg	6 meses
Multibacilar (MB)	Rifampicina 600mg	Clofazimina 50mg	12 meses
	Clofazimina 300mg	Dapsona 100mg	
Única Lesão (PB)	Rifampicina 600mg		Dose única
	Ofloxacino 400mg		
	Minociclina 100mg		

**Tabela 1: Esquema terapêutico determinado pela OMS conforme a forma clínica do paciente.** Esquema de tratamento para hanseníase elaborado pela OMS em 1891. Terapia com rifampicina, clofazimina e dapsona é realizado como tratamento de primeira linha para a doença. A combinação de medicamentos é realizada mensalmente sob supervisão médica. Fonte: Adaptado: Organização Mundial da Saúde., 2012.

## 1.7 Aspectos imunológicos gerais da hanseníase

A resposta imunológica contra o *M. leprae* define a evolução da doença, caracterizando uma diversificação no curso clínico da infecção. A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra patógenos, gerando uma resposta rápida, porém não específica contra a micobactéria (Goulart *et al.*, 2002).

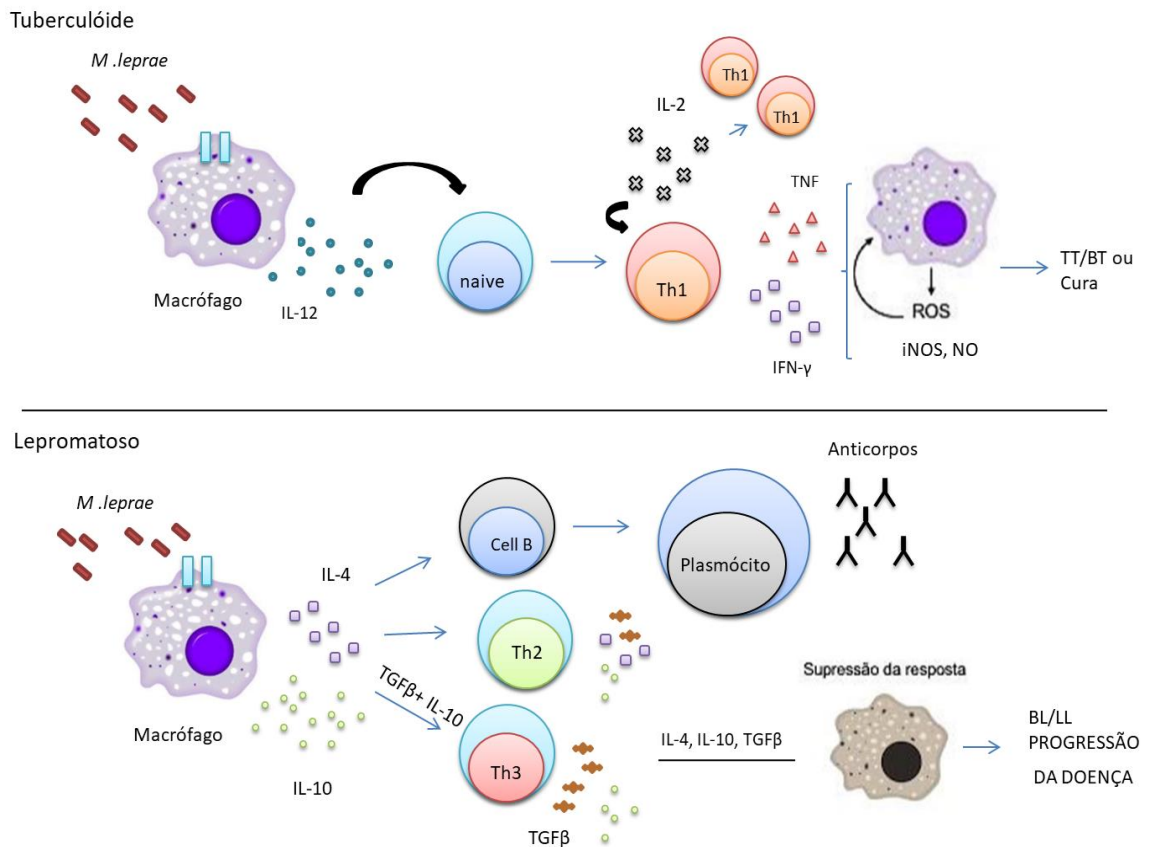
O primeiro contato entre a micobactéria e a célula do hospedeiro ocorre pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs), um exemplo são os Toll-like receptors (TLRs). Esses receptores reconhecem padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e estão presentes em células que compõem a imunidade inata como os macrófagos e células dendríticas. TLR2 e TLR4 são considerados os mais importantes para o reconhecimento de micobactérias (Brightbill *et al.*, 1999).

Após o reconhecimento, os macrófagos e células dendríticas apresentam o antígeno levando a ativação das células T *naives* pela secreção de IL-12 (Demangel *et al.*, 2000). Esse processo leva à diferenciação e expansão de células Th1 produtoras de interferon (IFN- $\gamma$ ), assim como a produção de TNF, fatores responsáveis pela eliminação do bacilo (Underhill *et al.*, 1999).

O perfil de resposta gerado frente ao bacilo está associado com as características observadas nas formas clínicas da hanseníase (Moraes *et al.*, 2006). A hanseníase é uma doença complexa no qual o bacilo modula a resposta imunológica do hospedeiro favorecendo sua sobrevivência e multiplicação. O antagonismo observado entre os polos do espectro da doença foi estabelecido como um “paradigma imunológico”, no qual a representação se baseia nos perfis Th1 e Th2 (Sousa *et al.*, 2017).

Na forma TT, a baixa carga bacilar se deve à produção de TNF e IFN- $\gamma$  gerados pelos linfócitos Th1. Estas citocinas ativam macrófagos e induzem a produção de radicais livres que destroem o bacilo. Já na forma LL, a resposta predominante é Th2 levando à produção de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  que inibem a capacidade microbicida dos macrófagos e regulam negativamente o perfil Th1, favorecendo a sobrevivência do bacilo (Figura 8) (Sousa *et al.*, 2017).





**Figura 8: Resposta imunológica da hanseníase de acordo com os polos da doença.** Os pacientes com hanseníase podem apresentar perfis de resposta imunológica distintos e isso se deve a resposta gerada pelo macrófago frente ao *M. leprae*. No polo tuberculóide, os macrófagos produzem IL-12 levando a uma diferenciação das células T *naive* para um perfil de resposta Th1. Os linfócitos Th1 produzem TNF e IFN- $\gamma$  levando ativação dos macrófagos pela produção de oxido nítrico sintase (iNOS) e NO (Óxido nítrico) que levam à destruição do *M. leprae*. No polo lepromatoso, os macrófagos produzem IL-4 e IL-10, levando a diferenciação das células B em plasmócitos que produzem anticorpos e também induz a diferenciação de células T *naive* para um perfil Th2 produtoras de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ . O TGF- $\beta$  junto a IL-10 induz a diferenciação das células Th para um perfil Th3 ( T reg). A produção de IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  inibem a ação microbicida dos macrófagos, favorecendo a sobrevivência do *M. leprae*. Adaptado: Goulart *et al.*, 2002 ( Elaborado pela autora - Fabiana dos Santos Pacheco).

## **1.8 Episódios reacionais na Hanseníase**

As reações hansênicas afetam 30-50% dos pacientes com hanseníase (Britton *et al.*, 2004). As reações são fenômenos inflamatórios agudos que podem se manifestar de maneira local ou sistêmica. Os pacientes podem ser acometidos antes, durante ou após o tratamento com a poliquimioterapia (Kamath *et al.*, 2014).

Os episódios reacionais geralmente acometem pacientes LL e pacientes *borderlines* (Kahawita *et al.*, 2008). As manifestações clínicas das reações possuem relação com a resposta imune do hospedeiro e podem ser classificadas como reação tipo 1 ou Reação reversa (RR) e reação tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH) (Scollard *et al.*, 2006).

Ambas as reações podem ocasionar incapacidades permanentes. Estudos sugerem que isso se deve ao tropismo do *M. leprae* pelas células de Schwann, levando a desmilitinização e consequente comprometimento neural devido a perda de função nervosa (de Freitas & Said, 2013). Além disso, no início dos episódios reacionais são detectados altos níveis de citocinas como IL-1, IL-6, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF no soro e em lesões cutâneas. (Khadge *et al.*, 2015).

### **1.8.1 Reação Reversa ou Reação tipo 1**

A RR é caracterizada clinicamente com uma exacerbação inflamatória de lesões de pele já existentes, também podendo ocorrer surgimento de novas lesões e neurites dolorosas (Kahawita *et al.*, 2008). As lesões existentes podem se tornar eritematosas e edemaciadas, podendo ulcerar (Goodless *et al.*, 1991). Edema de pés e mãos é comum nesses pacientes, mas sintomas sistêmicos são incomuns (Figura 9) (Kamath *et al.*, 2014). Essa reação geralmente acomete os pacientes *borderlines*, sendo mais comum em pacientes BT e BB quando comparado com pacientes BL (Pinheiro *et al.*, 2011).





**Figura 9: Paciente com Reação Reversa ou reação tipo.** Pacientes com reação reversa geralmente apresentam lesões eritematosas e edemaciadas, edemas de mãos e pés são comuns nesses pacientes, ao contrário de sistomas sistêmicos que são incomuns. (A) Paciente com hanseníase *borderline* lepromatosa que desenvolveu reação reversa e apresentando clinicamente mão direita edemaciada. (B) Paciente com hanseníase *borderline* lepromatosa com máculas que se tornaram eritematosas como consequência da reação reversa. Fonte: Kamath *et al.*,2014.

Em lesões de pele de pacientes RR, análises de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) demonstram que a expressão do RNAm das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-2, e IFN- $\gamma$  está aumentada e a expressão de citocinas no padrão Th2 está reduzida (Yamamura *et al.*,1992). Dosagens séricas demonstram níveis significativamente elevados de fatores pró-inflamatórios como IP-10, IL-17F, IL-1, IL-6 e TNF em pacientes com RR quando comparados com casos de hanseníase não reacional (Chaitanya *et al.*,2013).

Antígenos do *M. leprae* são encontrados nos nervos e na pele de pacientes com RR, localizados em células de Schwann e macrófagos (Lockwood *et al.*,2002). Em relação aos danos neurais ocasionados durante a reação. Estes estudos demonstram a participação da resposta imune inata nos danos neurais, uma vez que células de Schwann expressam TLR2, e a ativação ocorre por antígenos de *M. leprae* que resultam na morte destas células, sendo a possível causa para os danos neurais decorrentes dessa reação (Oliveira *et al.*,2003).

Das citocinas envolvidas na RR, o TNF é considerada uma das principais citocinas envolvidas na patologia do RR, isso pode ser explicado por estudos de imuno-histoquímica que

demonstraram a presença de TNF na pele e nos nervos de pacientes acometidos pela RR, em comparativo com pacientes não reacionais (Vinayakumar *et al.*,1995).

O tratamento da RR é realizado com uso de corticosteróides orais na dose de 0,5 a 1 mg/kg, sendo reduzido ao longo de um período de 4 a 6 meses. Controlando o processo inflamatório, os sinais e sintomas clínicos em casos mais leves desaparecem logo na primeira semana de tratamento (Naafs., 2003).

### 1.8.2 Reação Eritema Nodoso Hansênico ou Reação tipo 2

O ENH é uma complicação inflamatória grave da hanseníase. Essa reação imunológica acomete 50% dos pacientes LL e 5 a 10% dos pacientes na forma BL. Clinicamente ocorrem manifestações cutâneas de forma generalizada com surgimento nódulos eritematosos inflamados e pápulas, podendo ser superficiais ou profundos (Figura 10) (Pfaltzgraff & Ramu., 1994). Além disso, os sinais e sintomas são sistêmicos, clinicamente similares à sepse, pois apresentam alta leucocitose e mal estar intenso (Kamath *et al.*, 2014).



**Figura 10: Eritema Nodoso Hansênico (ENH).** Paciente com hanseníase Lepromatosa com reação ENH apresentando clinicamente pápulas, placas e nódulos de cor rosa brilhante ocorrendo nas extremidades superiores bilaterais. Fonte: Kamath *et al.*, 2014.

Em lesões de pele de pacientes com ENH são encontrados leucócitos polimofonucleares, principalmente neutrófilos. Durante anos o desencademanento do ENH foi associado a deposição de imunocomplexos. Atualmente o ENH é considerado como uma condição mediada por imunocomplexos e neutrófilos (Polycarpou *et al.*, 2017). Estudos sugerem que o curso clínico do ENH está relacionado com a produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios liberados sistemicamente ou no local da lesão (Martiniuk *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2010).

A imunopatogênese do ENH é complexa, os pacientes apresentam altos níveis de TNF e IL-1 $\beta$  no soro (Sarno *et al.*, 1991). Paralelamente, em lesões de pele é observado aumento na expressão de RNA mensageiro para IL-6, IL-8 e IL-10 (Yamamura *et al.*, 1992). A expressão de TNF também é observada nas lesões de pele, porém a expressão de IL-4 está ausente ou baixa (Teles *et al.*, 2002; Nath *et al.*, 2000).

O tratamento do ENH é feito pelo uso de altas doses de corticosteróides orais e talidomida (Walker *et al.*, 2015). Dos corticosteroides, a Prednisona é usada para o tratamento do ENH em casos moderados a graves (WHO., 2010). A dose utilizada geralmente é de 40-60 mg por dia, e de acordo com a resposta dos pacientes ao tratamento a dose é reduzida lentamente (Pocaterra *et al.*, 2006). A talidomida é extremamente eficaz no tratamento do ENH, usada para o tratamento de pacientes em casos moderados a grave. Sua eficácia no controle dos sintomas é observada em 24-48 horas após sua administração. O mecanismo de ação da talidomida ainda não está claro. Porém, estudos propõem que sua eficácia seja devido a sua ação na inibição de TNF (Tadesse *et al.*, 2006). Outros mecanismos também são propostos, como a estimulação da produção de IL-2 por células T e inibição do recrutamento de neutrófilos (Kamath *et al.*, 2014). Apesar da eficácia da talidomida, seu uso deve ser restrito devido ao seu potencial teratogênico (Lary *et al.*, 1999).

A Clofazimina é um agente antiinflamatório leve, usado para o tratamento de pacientes que apresentam clinicamente sintomas de leve a moderado do ENH, porém sua ação ocorre de forma lenta (Helmy *et al.*, 1971). A dose de clofazimina é de 300 mg por dia e o tratamento não deve exceder 12 meses, pois pode causar descoloração da pele (Jopling., 1976). Outros tratamentos alternativos para o ENH estão em estudo, como o uso de azatioprina, metotrexato, zinco oral e o infliximabe, um anticorpo monoclonal anti-TNF (Kahawita *et al.*, 2008).

Apesar de inúmeros estudos realizados, o entendimento sobre o ENH ainda permanece limitado. A complexidade e o agravamento do estado clínico decorrente desta reação, destacam a importancia de estudos sobre as vias inflamatórias associadas ao quadro. Estes

estudos nos permitirão um melhor entendimento sobre a reação além de propostas para diagnóstico pré-clínico, tratamento e prevenção do ENH.

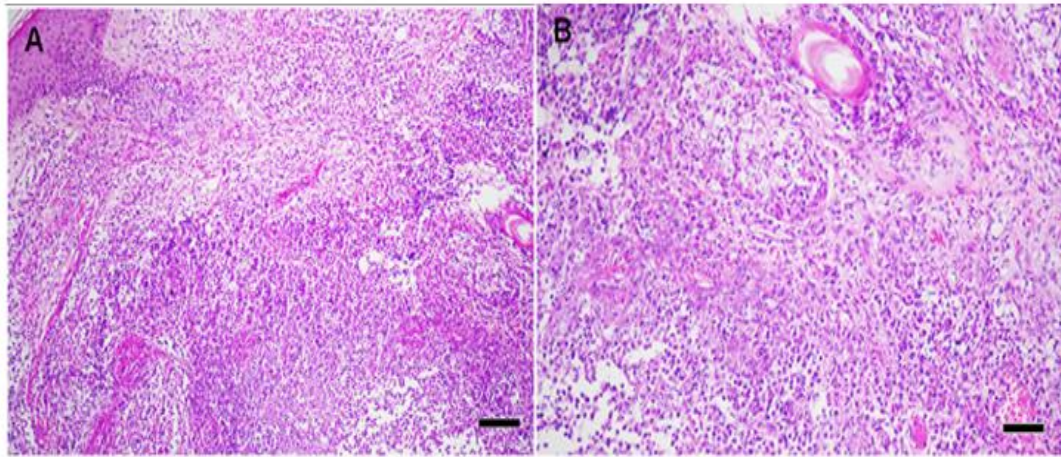
### **1.8.2.1 Neutrófilos no Eritema Nodoso Hansênico**

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes na circulação periférica, contribuem cerca de 50%-70% dos leucócitos totais em adultos saudáveis (Welch *et al.*,1989). Atuam como primeira linha de defesa contra patógenos invasores. Os neutrófilos eliminam microorganismos por diferentes mecanismos, como fagocitose, produção e liberação de quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas (Mortaz *et al.*, 2018). Em 2004 outro mecanismo de eliminação de microorganismos por neutrófilos foi descrito, a NETose (Zawrotniak *et al.*,2013). Esse processo consiste na formação de ‘redes’ que capturam os microorganismo, sendo capaz de matar ou suprimir a proliferação de fungos e bactérias (Brinkmann *et al.*,2004).

Durante a década de 70 estudos foram realizados sobre a função dos neutrófilos nas diferentes formas da hanseníase (Sher *et al.*,1978). A princípio foram realizados trabalhos em relação à ativação dos neutrófilos durante a doença. Para isso utilizaram nitro blue tetrazolium (NBT) e observaram um aumento na ativação neutrofílica em seis pacientes LL em estado reacional quando comparado com não reacionais ou doadores sadios (Goihman-Yahr *et al.*,1975). Outro trabalho demonstrou que soros de pacientes ENH possuem a capacidade de ativar neutrófilos de doadores sadios *in vitro* (Sher *et al.*,1978).

Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que neutrófilos isolados de pacientes LL com ou sem reação produzem IL-8 e TNF quando estimulados com *M. leprae in vitro*. Além disso, foi observado que neutrófilos de pacientes ENH apresentam apoptose acelerada, quando comparado com neutrófilos de doadores sadios ou BL/LL sem reação (Oliveira *et al.*,1999).

Durante um processo inflamatório, ocorre um rápido influxo de neutrófilos presentes no sangue periférico para o sítio de inflamação (Hyun *et al.*,2012). Os neutrófilos são considerados um marco histológico para o ENH. As lesões de pele de pacientes ENH possuem intenso infiltrado perivascular de neutrófilos ao longo da derme e subcutâneo (Figura 11) (Fridlender *et al.*,2009; Weber *et al.*,2011).



**Figura 11: Lesões de pele de pacientes com ENH.** (A) Como características histopatológicas as lesões cutâneas do ENH, apresentam predominante infiltrado neutrofílico localizados nas camadas mais profundas da derme e em tecido subcutâneo. (B) Presença de macrófagos espumosos e infiltrado neutrofílico Fonte: Schmitz *et al.*,2019.

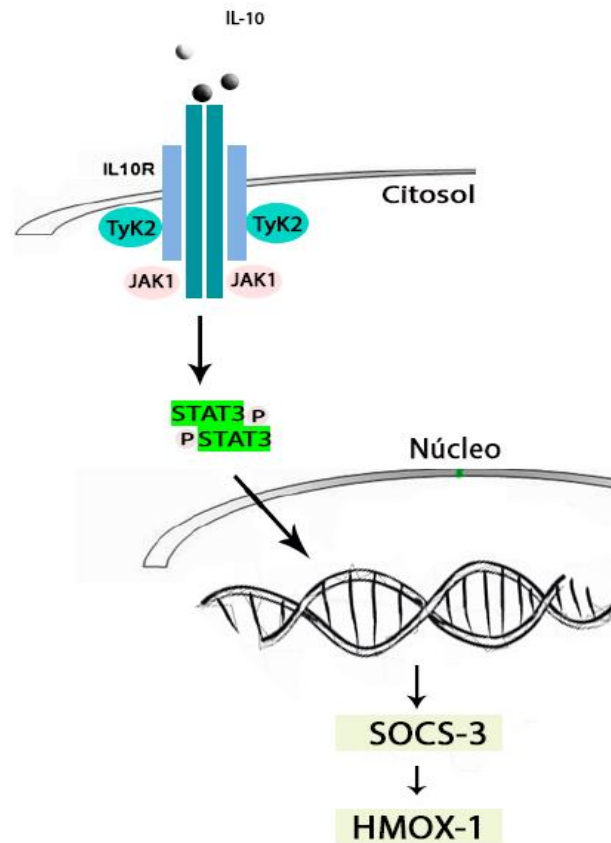
Os neutrófilos atuam como sensores biológicos. Alterações no microambiente resultam na expressão de diferentes moléculas em sua superfície (Elghetany *et al.*,2002). Estudos recentes demonstraram que durante o ENH, neutrófilos circulantes e presentes na lesão expressam CD64 em sua superfície, e o tratamento com talidomida reduziu essa expressão (Schmitz *et al.*, 2016). Análise de correlação também realizadas nesse estudo demonstrou que a gravidade dos pacientes ENH é diretamente proporcional aos níveis de expressão de CD64, marcador de ativação de neutrofílica. (Schmitz *et al.*, 2016).

A Pentraxina-3 (PTX3) é uma proteína presente no grânulo neutrofílico secundário, proteína induzida em resposta à sinais inflamatórios como TNF e IL-1 $\beta$  com funções na resposta imune inata e na inflamação. Nosso grupo demonstrou que esta proteína é liberada sistemicamente e nos sítios de lesão durante o ENH, porém o mesmo não foi observado na RR. Foi observado também que grande parte dos neutrófilos presentes na lesão expressam PTX3, e assim como ocorrido com o CD64, o tratamento com a talidomida diminuiu essa expressão (Mendes *et al.*, 2017).

A busca por biomarcadores é um campo promissor nos estudos sobre o ENH. O estudo sobre a expressão de CD64 em neutrófilos, por exemplo, aponta para este receptor de superfície como um promissor biomarcador pré-clínico para o ENH, assim como um marcador de severidade (Schmitz *et al.*, 2016). Já em relação à PTX3, este estudo fornece um novo alvo molecular para o controle da patogênese do ENH (Mendes *et al.*, 2017).

### **1.9 Via IL-10/IL-10R**

A Interleucina-10 (IL-10) é secretada por diversos tipos celulares incluindo monócitos/macrófagos, linfócitos B e subclasses de linfócitos TCD4+. Possui como função biológica o controle homeostático da resposta imunológica, controlando a diminuição e duração do processo inflamatório. O efeito da IL-10 ocorre pela sua capacidade de bloquear seletivamente a expressão de genes pró-inflamatórios que codificam citocinas e quimiocinas produzidas por células mielóides ativadas por ligantes de PRRs como o LPS (Moore *et al.*, 2001). A expressão dos receptores IL-10R1 e IL-10R2 são fundamentais para a responsividade à IL-10. Os efeitos biológicos da IL-10 se iniciam pela ligação com uma estrutura heterodimérica, composta pelas subunidades IL-10R1 e IL-10R2. A IL-10 possui uma alta afinidade pela IL-10R1, porém a cascata de sinalização só é iniciada se houver a presença da IL-10R2, ambas são necessárias para que a transcrição dos genes da via da IL-10 seja realizada (Kotenko *et al.*, 1997). Após a ligação da IL-10 com seu receptor heterodimérico ocorre interação das tirosinas kinases Janus kinase 1 (JAK1) e Tyrosina Kinase 2 (Tyk2), que se ligam, respectivamente, a IL-10R1 e IL-10R2 (Kotenko *et al.*, 1997; Kotenko, 1998). Posteriormente ocorre a fosforilação da primeira proteína da via, a STAT3. Após a ativação da STAT3 temos a transcrição de outros componentes da via, SOCS-3 e HMOX-1, desta forma os efeitos anti-inflamatórios da IL-10 são iniciados (Figura 12) (Bazzoni *et al.*, 2010).



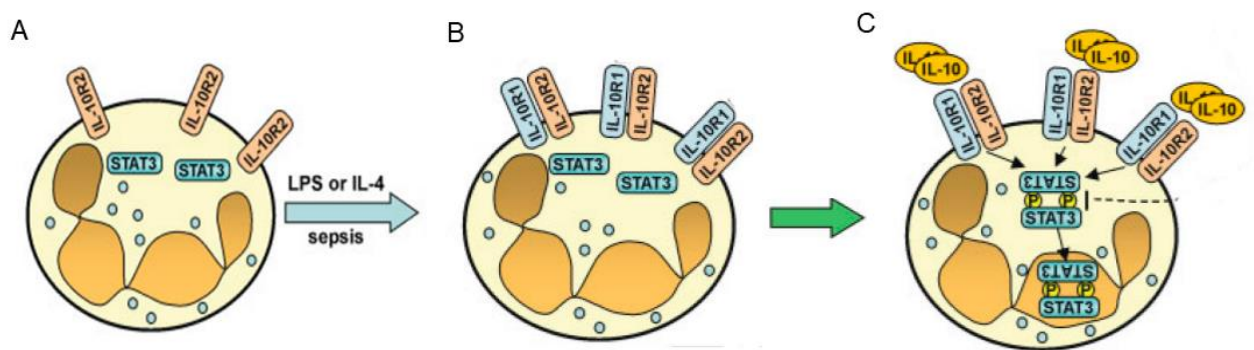
**Figura 12: Representação esquemática da ligação da IL-10 e seu receptor heterodimérico.** A IL-10 ao se ligar ao receptor composto pelas subunidades IL-10R1 e IL-10R2 inicia uma cascata de sinalização, onde ocorre a interação de JAK1 e Tyk2 nos receptores IL-10R1 e IL-10R2, respectivamente. Induzindo a fosforilação de STAT3, a primeira proteína da via a ser ativada. Posteriormente temos a transcrição de SOCS-3 e HMOX. Desta forma, ocorrem os efeitos antiinflamatórios da IL-10. Adaptado: Fioranelli *et al.*,2014 (Elaborado pela autora Fabiana dos Santos Pacheco).

IL-10 é considerada como uma molécula chave para a inibição da síntese de citocinas pró-inflamatórias produzidas por vários tipos celulares, como linfócitos, monócitos e macrófagos, exercendo dessa forma ação inibitória em citocinas consideradas como marcadores do processo inflamatório, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF, GM-CSF e IFN- $\gamma$  (Bijjiga.,2013). Inibe perfis de resposta gerados por linfócitos, Th1 e Th2. Possui efeito predominante na subpopulação Th1, inibindo a produção de IFN- $\gamma$  e TNF, pela supressão da síntese de IL-12, promovendo o predomínio da resposta Th2.



A IL-10 não possui apenas função inibitória em citocinas pró-inflamatórias, mas também induz a produção de fatores antiinflamatórios como IL-1RA (Steinbrink *et al.*,1997).

Durante o processo inflamatório os neutrófilos secretam diversas citocinas pró-inflamatórias (Cassatela., 1999). Como já descrito anteriormente, a responsividade de uma célula a IL-10 é dependente da expressão das duas cadeias: IL-10R1 e IL-10R2 (Bazzoni *et al.*,2010), porém neutrófilos circulantes expressam constitutivamente somente a cadeia IL-10R2. Por outro lado, estudos demonstram que neutrófilos de doadores saudáveis quando estimulados com LPS *in vitro* por 4 horas passam a expressar a cadeia IL-10R1 (Cassatela *et al.*,2005). Esse achado também foi observado em neutrófilos purificados do sangue periférico de pacientes com sepse, e mais importante, a expressão da cadeia IL-10R1 fez com que os neutrófilos respondessem à IL-10, ativando componentes da via STAT3 (Figura 13) e modulando negativamente citocinas pró-inflamatórias (Tamassia *et al.*,2008).



**Figura 13:** A responsividade de neutrófilos à IL-10 é dependente da expressão do receptor IL-10R1. (A) neutrófilos expressam constitutivamente a cadeia IL-10R2. (B) após a incubação com LPS ou IL-4 *in vitro* ou durante a sepse, neutrófilos passam a expressar a cadeia IL-10R1. (C) Responsividade à IL-10 em termos de fosforilação da primeira proteína da via IL-10/IL-10R, a STAT3. Fonte: Bazzoni *et al.*,(2010)



## 1.10 JUSTIFICATIVA

As reações hansênicas afetam de 30 a 50% dos pacientes com hanseníase (Britton *et al.*,2004). As reações são fenômenos inflamatórios agudos que podem se manifestar de maneira local ou sistêmica. Essas reações são responsáveis pelo agravamento do estado clínico do paciente, ocasionando danos neurais que tem como consequências as incapacidades físicas permanentes características da doença (Scollard *et al.*, 2006).

O ENH é uma complicação inflamatória grave da hanseníase. Essa reação imunológica acomete 50% dos pacientes LL e 5 a 10% dos pacientes acometidos pela forma BL (Pfaltzgraff & Ramu.,1994). Nas lesões de pele são encontrados leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Atualmente o ENH é considerado uma reação mediada por neutrófilos (Polycarpou *et al.*,2017). Estudos pioneiros do nosso grupo demonstraram que neutrófilos isolados de pacientes LL com ou sem reação produzem IL-8 e TNF quando estimulados com *M. leprae in vitro* (Oliveira *et al.*,1999). Atualmente, muitos trabalhos vêm sendo realizados a respeito do envolvimento dos neutrófilos na imunopatogênese da hanseníase, mais especificamente durante o ENH. Recentemente Schmitz *et al* demonstraram a expressão de CD64 em neutrófilos circulantes e de lesão, esse achado foi apontado como um promissor biomarcador para o ENH e como um marcador para a gravidade do quadro clínico (Schmitz *et al.*, 2016). Nosso grupo também demonstrou que a PTX3, proteína presente no grânulo secundário do neutrófilo, é liberada sistemicamente e nos sítios de lesão durante o ENH, contribuindo dessa forma para o melhor entendimento sobre a imunopatogênese do ENH (Mendes *et al.*,2017).

Assim como na sepse durante o ENH, os pacientes podem apresentar uma leucocitose neutrofílica e um mal-estar intenso (Brown *et al.*,2006). Estudos demonstram que durante a sepse os neutrófilos passam a expressar o receptor IL-10R1 e se tornam prontamente responsivos a IL-10, características não observadas em neutrófilos de doadores sadios (Tamassia *et al.*,2008).

Isso se deve ao fato de que durante alterações no microambiente os neutrófilos alteram suas moléculas de superfície (Elghetany *et al.*,2002). Estudos como o do CD64 e a IL-10R1 sendo expressos na superfície dos neutrófilos reforçam este dado. Em contrapartida, a IL-10 regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, desta forma controlando a inflamação (Bijjiga.,2013).

O estudo de vias antiinflamatórias nos permite pensar em novas intervenções terapêuticas para o controle e prevenção do ENH. A busca da expressão de antígenos que são produzidos em condições patológicas nos ajuda na descoberta de biomarcadores que permitem o diagnóstico precoce. Com base nesses estudos, nosso trabalho buscou contribuir para o melhor entendimento do papel dos neutrófilos na imunopatogênese do ENH, assim como um possível papel para a IL-10 como um alvo molecular terapêutico e diagnóstico. Nossa hipótese é de que o *M. leprae* induz a expressão de IL-10R1 em neutrófilos, tornando-os responsivos a IL-10.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial da via da IL-10 em neutrófilos durante a reação Eritema Nodoso Hansênico.

### 2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar os níveis de expressão de IL-10R1 em neutrófilos circulantes de pacientes BL/LL e ENH antes e após 7 dias de tratamento com talidomida.
2. Investigar a presença de neutrófilos IL-10R1<sup>+</sup> nas lesões de pele de pacientes ENH antes do tratamento com talidomida.
3. Analisar a capacidade do *M. leprae* em induzir a expressão de IL-10R1 em neutrófilos humanos.
4. Avaliar as citocinas produzidas por neutrófilos em resposta ao *M. leprae*.
5. Analisar se neutrófilos circulantes de pacientes BL/LL e ENH e neutrófilos de doadores sadios após o estímulo com *M. leprae* respondem a IL-10 *in vitro*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Pacientes e doadores sadios

Esse estudo foi conduzido juntamente com o Ambulatório Souza Araújo, referência em diagnóstico e tratamento para hanseníase (Laboratório de Hanseníase, IOC/FIOCRUZ) e aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa com Seres Humanos (CEP-Fiocruz/IOC) (CAAE56113716.5.0000.5248). Todos os pacientes envolvidos neste estudo assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido. A hanseníase foi diagnosticada em indivíduos que apresentaram manchas de pele hipopigmentadas e anestésicas e/ou espessamento de nervos periféricos e/ou a presença de bacilo álcool ácido resistentes em amostras de biópsias de lesão de pele. Os pacientes com hanseníase usados neste estudo foram classificados de acordo com a escala de Ridley e Jopling (Ridley e Jopling, 1966). Os critérios de inclusão foram: pacientes que apresentam diagnóstico clínico de hanseníase *borderline* lepromatosa (BL), Lepromatosa Lepromatosa (LL) antes do tratamento com a PQT com ou sem reação eritema nodoso hansênico (ENH) antes do tratamento com talidomida e 7 dias após o tratamento. Os critérios de exclusão do estudo foram: Pacientes com hanseníase que apresentam comorbidade (infecção HIV, diabetes, câncer, gravidez e imunocomprometidos e imunossuprimidos). A partir destes critérios a população de estudo foi dividida em 3 grupos: Grupo 1: Doadores Sadios, Grupo 2: Pacientes Multibacilares sem reação e Grupo 3: Pacientes Multibacilares com ENH.

#### 3.2 Coleta de sangue e purificação de neutrófilos

As amostras dos indivíduos incluídos neste trabalho foram obtidas pelo processamento de sangue em câmara de fluxo laminar respeitando as normas e precauções para manipulação de material biológico. Amostras de sangue periférico de pacientes e doadores sadios (50 mL) foram coletadas utilizando Vacutainer BD, e colocadas em tubos heparinizados (BD Bioscience). O sangue foi diluído numa proporção 1:1 em solução salina tamponada (PBS) e submetido à centrifugação a 913 xg sobre gradiente de Ficoll-Paque (densidade: 1,077 g/mL; GE Healthcare Life Sciences) durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após a separação, o pellet de neutrófilos acima das hemácias foi coletado. Para exclusão de eritrócitos contaminantes foi adicionado 40 mL de solução de lise dos eritrócitos (eritrócitos (ACK – 1,7

M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 0,1M de  $\text{KHCO}_3$  e 1 mM EDTA), realizando duas lavagens com esta solução, durante 10 minutos na primeira etapa e 5 minutos na segunda a 514 xg por 10 minutos a 4°C para obtenção do pellet de neutrófilos. Após a lise de hemácias, foi realizada uma lavagem com PBS gelado para retirada do resquícios de ACK sendo centrifugado a 514 xg por 10 minutos a 4°C. O pellet de neutrófilos foi ressuspensão em 1mL de meio RPMI 1640 (LGC biotecnologia LTDA), 10  $\mu\text{L}$  foram retirados e diluídos 1:20 em azul de tripan (Sigma-Aldrich) para a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer.

### 3.3 Análise de grau de pureza

Alíquotas de 80  $\mu\text{L}$  da suspensão celular (diluídas 100 vezes) foram submetidas à citocentrifugação (Shandon Cytospin 3) a 325 xg durante 5 minutos. Após a citocentrifugação, utilizamos o sedimento para confeccionar as lâminas em duplicatas. Após a fixação das amostras na lâmina pelo metanol, as células foram coradas pelo Panótico rápido (Laborclin), posteriormente foram contadas e diferenciadas 100 células em microscopia de campo claro (1000x) e determinada a porcentagem de neutrófilos. Outro parâmetro utilizado foi a citometria de fluxo. Para isso  $5 \times 10^5$  células por tubo foram centrifugadas a 2000 RPM por 5 min à 4°C, o sobrenadante foi descartado após a centrifugação. Em seguida, as células foram ressuspensas em 10 $\mu\text{L}$  de solução de bloqueio (PBS + 1% Albumina Sérica Bovina (BSA) + 5% Soro Normal Humano) e incubadas por 30 min a 4°C. Após o tempo de bloqueio, foi adicionado 0,031 $\mu\text{g}/\text{mL}$  de anticorpo anti-CD16 conjugado a PECy7 (BD Bioscience) + 39 $\mu\text{L}$  de Tampão de Facs (1% de BSA + PBS) e incubados no escuro durante 30 minutos a 4°C. Após o tempo de incubação foi adicionado 200 $\mu\text{L}$  de tampão de FACS ao tubo e as células foram centrifugadas a 325 xg a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os neutrófilos foram ressuspensos em 200 $\mu\text{L}$  de 4% Paraformaldeído (PFA) por 5 minutos para fixação. A aquisição foi realizada no citometro FACSCalibur no canal PE (FL-2) (BD Bioscience), após a aquisição de  $5 \times 10^4$  células dentro do *gate* de morfologia (FSC x SSC). Os histogramas foram montados utilizando o software Flow Jo.

### 3.4 Cultura de neutrófilos

Os neutrófilos purificados do sangue periférico foram plaqueados em placas de 12 poços contendo 1mL de meio RPMI1640 suplementado com 1% L-Glutamin (1mg/mL) a, 1% de solução Penicilina + Streptomicina (1mg/mL) e 10% Soro Fetal Bovino.  $3 \times 10^6$  células foram colocadas por poço e estimuladas com concentrações de *M. leprae* irradiado (1,10,50  $\mu\text{g/mL}$ ; BEI Resources). O *M. leprae* foi fornecido por James Krahenbuhl (National Hansen's Disease Program, Laboratory Research Branch, Universidade Estadual da Louisiana, Baton Rouge, LA, EUA) do National Institute of Allergy and Infectious Diseases/ NIH (Bethesda, MD, EUA). O *M. leprae* foi obtido a partir de footpads de camundongos atímicos *nu / nu*. Os neutrófilos foram incubados durante 4 horas em estufa a 37° C e 5% CO<sub>2</sub>. Após as 4 horas de incubação foi adicionado em alguns poços 20ng/mL de IL-10 recombinante (Peprotech), ficando em incubação por mais 20 horas. Após o período de incubação as amostras foram coletadas dos poços e colocadas em eppendorfs para centrifugação a 913 xg a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi coletado e armazenado a -20°C para dosagens de citocinas e quimiocinas por ELISA.

Para ensaio de citometria de fluxo, os neutrófilos foram lavados com 200 $\mu\text{L}$  de PBS e fixados por 5 minutos com 4% de PFA, os neutrófilos foram lavados com PBS para retirada de PFA, o sobrenadante foi descartado e os neutrófilos foram ressuspensos em Tampão de Facs (PBS + 1% de BSA) a 4°C. Outra centrifugação igual à anterior foi realizada, o sobrenadante foi descartado e os neutrófilos foram ressuspensos e armazenados a 4°C em solução de PBS + 0,1% de BSA.

### 3.5 Expressão de IL-10R1 na superfície dos neutrófilos

Os neutrófilos fixados a partir da purificação foram centrifugados a 913 xg a 4°C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e  $5 \times 10^5$  neutrófilos foram separados para cada marcação. Para bloqueio de ligações inespecíficas foi adicionado em cada eppendorf 50 $\mu\text{L}$  de 5% de Soro Normal Humano, 1% de Albumina Sérica Bovina (BSA) e 0,01 M de PBS durante 30 minutos a 4°C. Após o tempo de bloqueio, os neutrófilos foram marcados com 0,125 $\mu\text{g/mL}$  de anti-IL-10R1 (Santa Cruz Biotechnology) e a incubação foi feita por 40 minutos, a 4°C. Posteriormente as células foram centrifugadas como já descrito anteriormente e o sobrenadante foi descartado. Por fim os neutrófilos foram corados com imunoc conjugado IgG anti-mouse FITC-conjugado (Isotiocianato de fluoresceína) (DAKO, Santa Clara, USA),

a incubação foi feita com proteção da luz, durante 40 minutos a 4°C. Após a marcação os neutrófilos foram centrifugados, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 µl de PBS + 1% de BSA. A expressão de IL-10R1 na superfície dos neutrófilos foi mensurada utilizando o citometro FACSCalibur (Plataforma de Citometria, IOC/ FIOCRUZ). As análises no citometro foram realizadas no canal do FITC (FL-1) com no máximo de 10.000 eventos, com as células dentro do *gate* de morfologia (FSC x SSC). Os histogramas foram realizados no software Flowjo, a mediana de fluorescência (MFI) foi realizada a partir da subtração do MFI do anticorpo com o MFI do imunoconjugado.

### **3.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA)**

Os sobrenadantes das culturas de neutrófilos e amostras de soro de pacientes foram utilizados para dosagem de citocinas e quimiocinas, utilizando kits comerciais. Para análise das concentrações de TNF, IL-8, IL-1 $\beta$  e TGF $\beta$ -1 foram usados sobrenadantes de cultura. Já para dosagem de IL-10 foram utilizadas amostras de soro de pacientes com hanseníase de diferentes grupos. As dosagens de TNF, IL-8, IL-1 $\beta$ , TGF $\beta$ -1 e IL-10 foram realizadas utilizando kits da marca eBioscience; Thermo Fisher Scientific. E para dosagens de IL-1RA e MIP-1 $\beta$  com kit Peprotech.

Todos os ensaios foram performados em duplicatas com diluição de 1:10. As metodologias utilizadas para as dosagens foram recomendadas pelos fabricantes. Os resultados foram expressos em pg/mL e os resultados foram processados pelo software SoftMax Pro, versão 4.8 (Molecular Devices).

### **3.7 Imunofluorescência**

Secções de lesões de pele congeladas foram realizadas em criostato Leica LM3000, fixado em acetona e hidratadas com PBS 0,01M. As ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS 0,01M, 0,3% Triton X-100, 2% Albumina Sérica Bovina (BSA) e 5% de Soro Normal de Cabra (NGS; Sigma Aldrich), por 1 hora em temperatura ambiente. Para a marcação de IL-10R1 utilizamos anticorpo monoclonal de camundongo anti-IL-10R1 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology) e os neutrófilos foram evidenciados com anticorpo policlonal de coelho anti-mieloperoxidase (1:100; Santa Cruz Biotechnology). Como anticorpos secundários utilizamos IgG anti-*rabbit* conjugado com Alexa Fluor 633 e IgG 2a

anti-*mouse* conjugado com Alexa Fluor 594 (ThermoFisher Scientific). Os anticorpos secundários foram utilizados na concentração de 1:1000. Os núcleos foram marcados com 4',6-diamidino-2-fenilindole (DAPI; 1:1000). A imunofluorescência foi observada usando o software AxioVision Rel.4.8 em microscópio de fluorescência Colibri (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens foram adquiridas com a câmera digital AxioCamHRm. As edições de imagem foram realizadas utilizando o programa Adobe Photoshop CS6.

### **3.8 Análises estatísticas**

Os resultados dos ensaios por citometria foram representados em forma de *dotplots*. A análise estatística foi realizada com o programa GraphPad Prism versão 6 (GraphPad Software, San Diego, EUA). As comparações entre 3 grupos de dados não distribuídos normalmente foram examinados por meio de teste de Kruskal-Wallis com teste de comparação múltipla de Dunn. As diferenças entre os dois grupos foram avaliadas pelo teste t de Student de duas caudas. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar amostras pareadas. O nível de significância estatística adotado foi  $P < 0,05$ .



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Estabelecimento de coorte de pacientes

Grupo	Amostras	Ensaio	Idade (mediana)	ILB (Mediana)
Sadios n=19	PMN purificado Sobrenadante	<u>Citometria</u> ELISA	25,6	-----
BL/LL n=14	PMN purificado Sobrenadante	<u>Citometria</u> ELISA	47,0	4,55
ENH D0 n=30	PMN purificado Amostra de lesão Sobrenadante Soro	<u>Citometria</u> <u>Imunofluorescência</u> ELISA ELISA	40,5	3,6
ENH D7 n=16	PMN purificado Sobrenadante Soro	<u>Citometria</u> ELISA	49,5	3,3
ENH D14 n=5	PMN purificado	<u>Citometria</u>	48	2,0

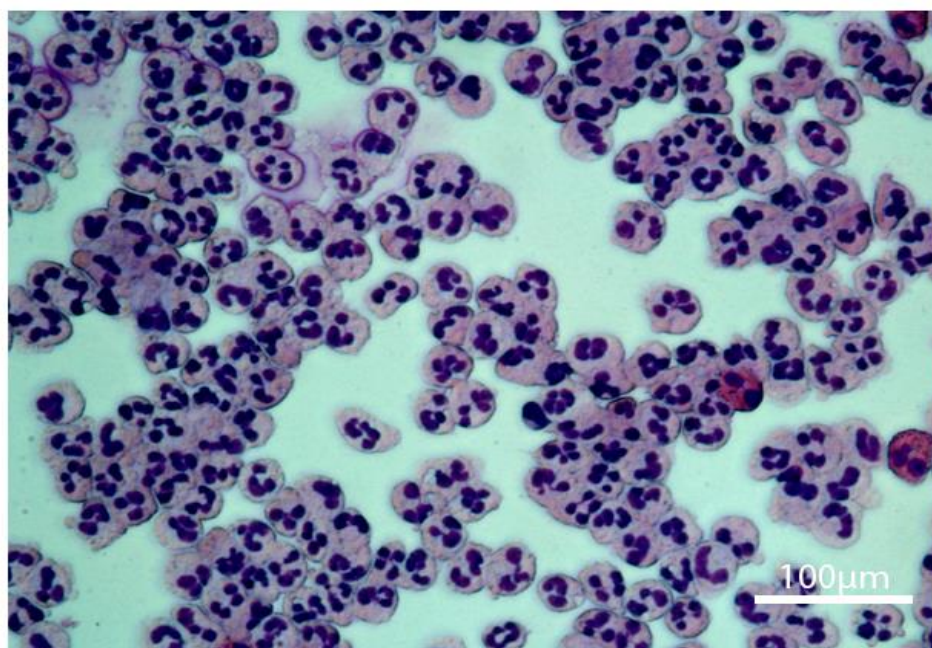
**Tabela 2: Dados demográficos e clínicos dos voluntários incluídos no estudo.** Tipos de amostras obtidas e ensaios realizados estão descritos na tabela. **Abreviaturas** : BL, borderline-lepromatosa; LL, forma polar lepromatosa; ENH dia 0, eritema nodoso hansenico no diagnóstico; ENH dia 7, eritema nodoso hansenico 7 dias após o tratamento com a talidomida; ENH dia 14, eritema nodoso hansenico 14 dias após o tratamento com a talidomida; ILB, índice logarítmico da biópsia.

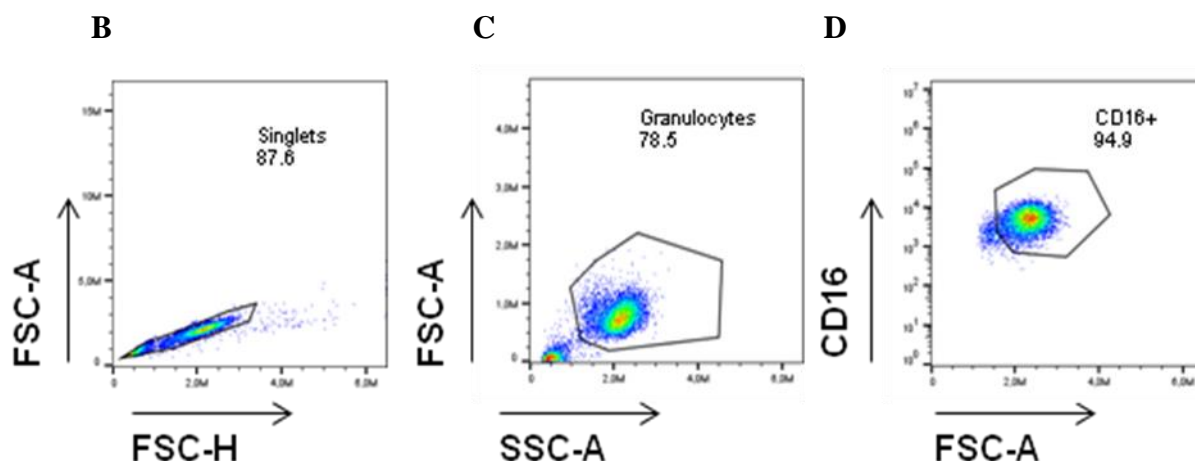
## 4.2 Análise do grau de pureza da purificação de neutrófilos circulantes do sangue periférico

O fracionamento do sangue periférico foi realizado com uso de gradiente de densidade de Ficoll. Antes da distribuição dos neutrófilos para os experimentos deste estudo, realizamos primeiramente a padronização da purificação de neutrófilos. A análise do grau de pureza das preparações foi realizada por análise morfológica. As suspensões celulares foram citocentrifugadas e posteriormente coradas com kit panótico. Os nossos resultados demonstram um alto grau de pureza nas preparações (>95%; Figura 14A).

Alternativamente, avaliamos o grau de pureza de nossas amostras por citometria de fluxo. Utilizamos um anticorpo que reconhece CD16, antígeno expresso constitutivamente na membrana de neutrófilos maduros (Elghetany *et al.*,2002), a fim de corroborar nossas análises anteriores do cytopsin. Como estratégia inicial identificamos os singlets, a fim de excluir os possíveis eventos celulares duplicados (“doublets”), que foram excluídos utilizando um gráfico “dot plot” FSC-A vs FSC-H (Foward Scatter – área; Figura 14B). A partir deste parâmetro realizamos o *gate* na população de neutrófilos, usando FSC (FowardScatter) e SSC (SideScatter), tamanho e granulosidade, respectivamente e posteriormente neutrófilo CD16 positivos (Figura 14C e D).

A





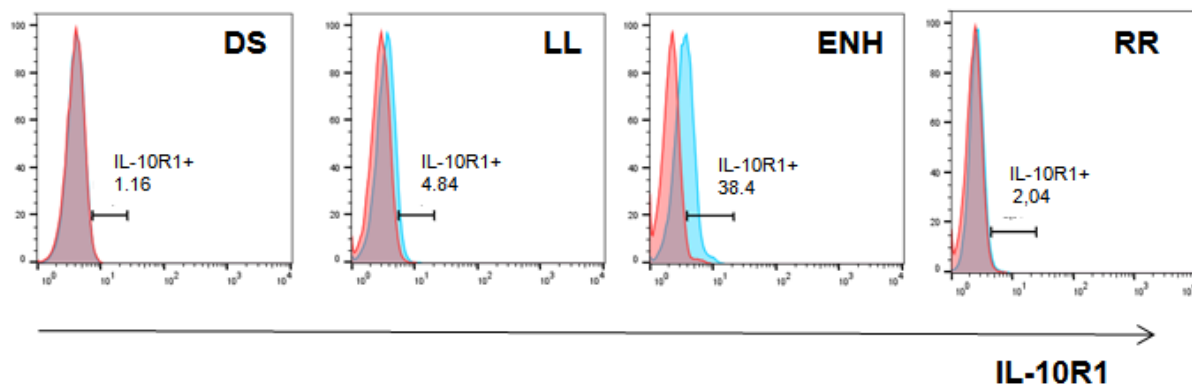
**Figura 14: Análise de grau de pureza da preparação de neutrófilos.** (A) Imagem representativa de lâmina citocentrifugadas de neutrófilos purificados de doadores sadios (n=4). Aumento de 400x. A barra de escala corresponde a 100 $\mu$ m (B) gráficos *dot-plot* representativos de citometria de fluxo de neutrófilos de doadores sadios CD16<sup>+</sup>. *Gate* feito por FSC-A vs. FSC-H para análise de singlets para exclusão dos doublets. (C) O *gate* da população de granulócitos foi feito por FSC-A vs. SSC. (D) A porcentagem de células CD16<sup>+</sup> foi dada pelo *gate* FSC vs. CD16 (n=4).

### 4.3 Expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos circulantes de pacientes com reação Eritema Nodoso Hansênico (ENH)

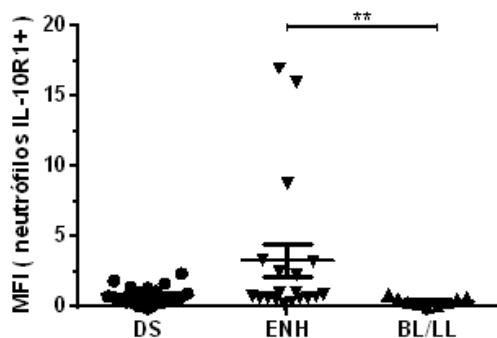
Neutrófilos de doadores saudáveis expressam constitutivamente em sua superfície o receptor IL-10R2, porém não expressam IL-10R1, e por isso não respondem a IL-10 (Cassatela *et al.*, 2005). Para avaliar se neutrófilos circulantes de pacientes ENH expressam IL-10R1 realizamos a purificação de neutrófilos do sangue periférico de doadores saudáveis (DS) (n=19), pacientes ENH (n=19), pacientes multibacilares (BL/LL) não reacionais (n= 9), pacientes RR (n= 3) e em seguida realizamos as marcações para análise por citometria de fluxo. Nossos resultados demonstram que a expressão de IL-10R1 foi exclusiva em pacientes ENH, como apresentado nos histogramas representativos (Figura 15A). A análise da mediana de intensidade de fluorescência (MFI) revelou que os níveis médios de MFI de pacientes ENH foi cerca de 15 vezes maior que de pacientes BL/LL ( $4,695 \pm 2,124$  e  $0,2967 \pm 0,1828$ , respectivamente; Fig. 15B).

Além disso, a frequência de neutrófilos IL-10R1+ foi cerca de 9 vezes maior quando comparamos pacientes ENH e BL/LL ( $21,53 \pm 4,533$  e  $2,280 \pm 1,373$ , respectivamente;  $p < 0,001$ ; Fig. 15C). Em conjunto, esses dados demonstram que neutrófilos ENH exibem seletivamente expressão aumentada de IL-10R1 na superfície.

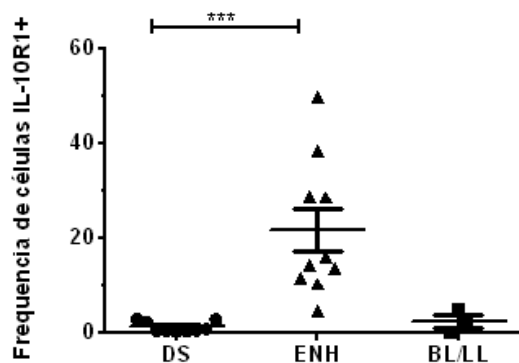
A



B



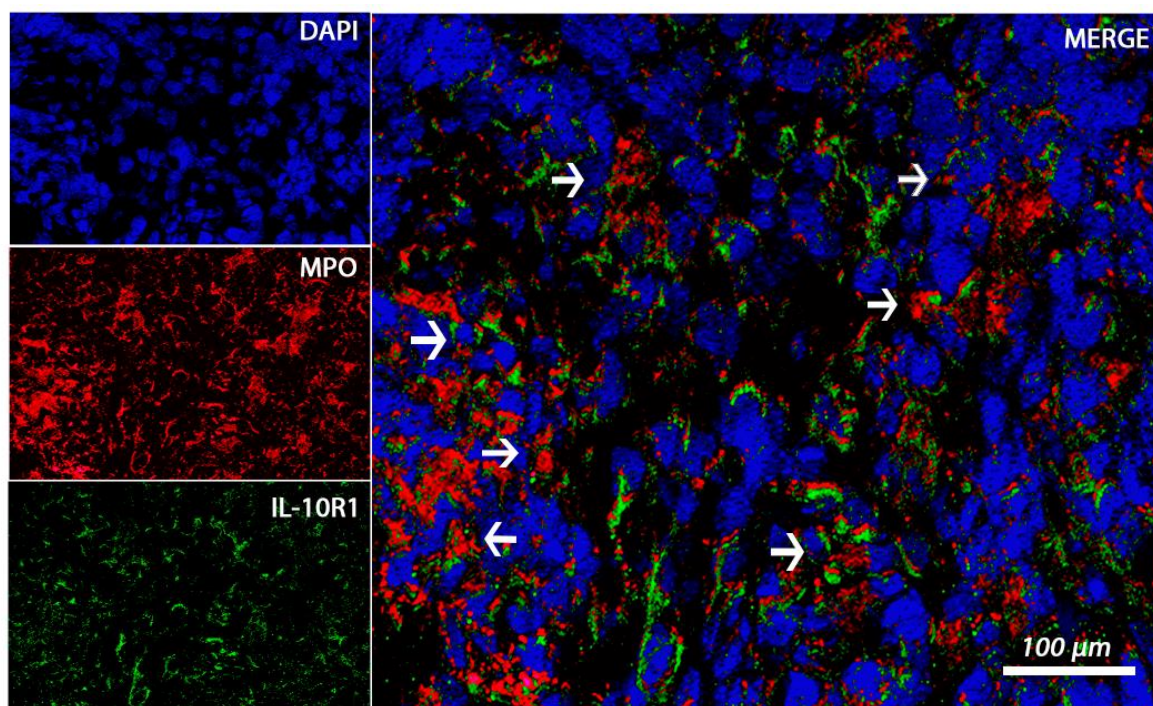
C



**Figura 15: Expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos circulantes de pacientes ENH.** Os neutrófilos foram corados em duas etapas com anticorpo murino anti-IL-10R1 humano, seguido da marcação com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC). O controle negativo foi realizado com uso do anti-IgG de camundongo conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) sem a presença do anticorpo primário. (A) Padrão de expressão de IL-10R1. Dados demonstrados através de histogramas representativos de cada grupo. Doadores Sadios (n=19), Pacientes ENH (n=19). Pacientes multibacilares (BL/LL) não reacionais (n=9), Pacientes Reação Reversa (RR; n=3). (B) Valores de mediana da intensidade de fluorescência (MFI) e (C) frequência de células IL-10R1+. O MFI foi calculado subtraindo o MFI dos neutrófilos marcados com IL-10R1 do MFI da célula marcada com anticorpo secundário correspondente. Cada ponto representa um paciente. As barras horizontais representam as médias  $\pm$  erro padrão (\*\*\*)  $P < 0.001$ ; teste de Kurskal-Wallis).

#### 4.4 Expressão de IL-10R1 em neutrófilos presentes na lesão de pacientes ENH

Os neutrófilos representam um marco histológico do ENH (Polycarpoy *et al.*,2017), com isso analisamos se os neutrófilos presentes na lesão de pacientes ENH expressam IL-10R1 assim como os neutrófilos do sangue periférico. Nossos resultados demonstraram que os neutrófilos, células mieloperoxidase positivas (MPO<sup>+</sup>) presentes na lesão também expressam o receptor IL-10R1 em sua superfície (Figura 16).

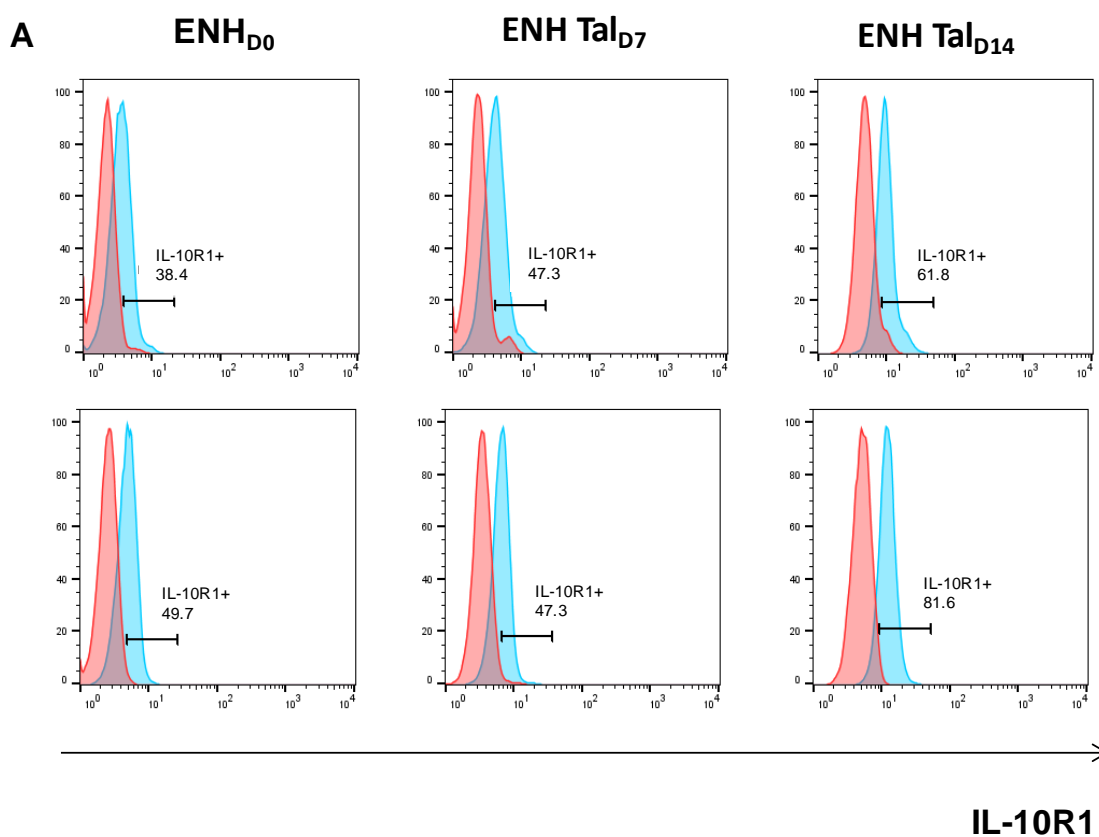


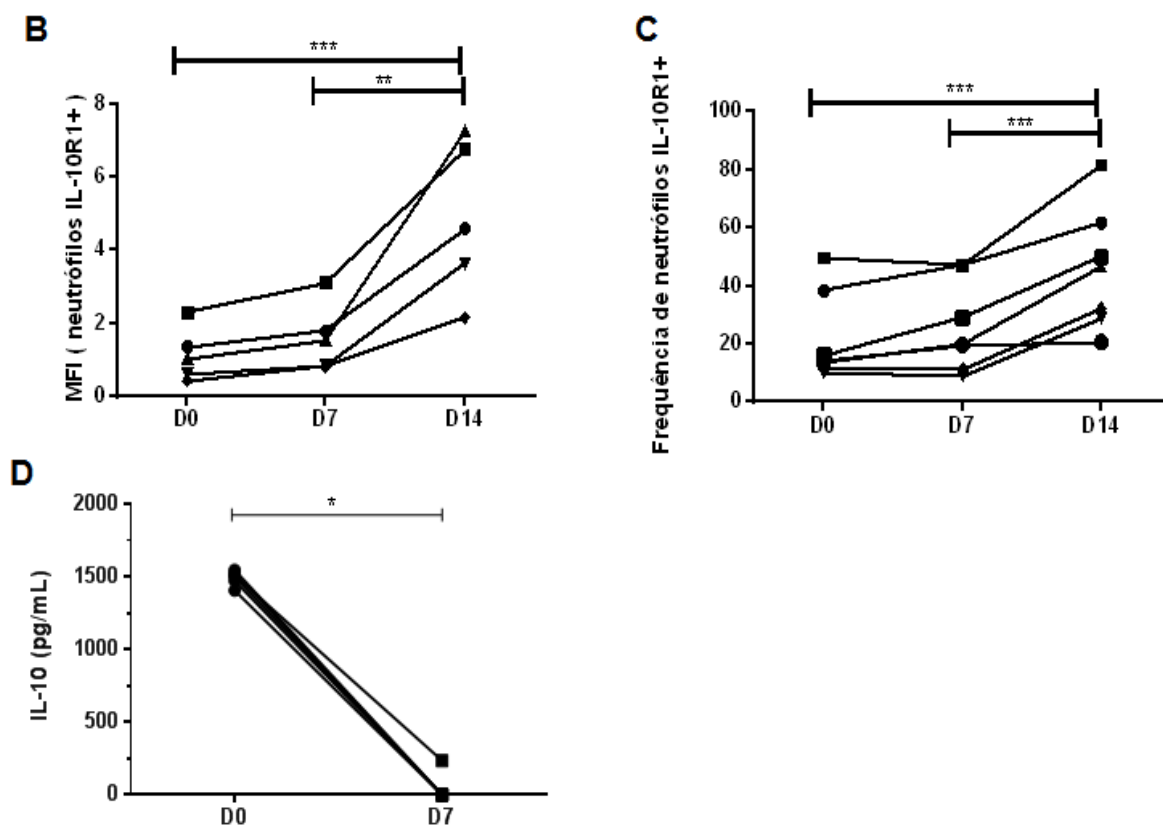
**Figura 16: Expressão de IL-10R1 em neutrófilos de lesão de pacientes ENH.** Imagem representativa de imunofluorescências em cortes histológicos de lesão de pele de 3 pacientes ENH. Corte histológico de paciente ENH antes do início do tratamento com a talidomida. Neutrófilos foram considerados células mieloperoxidase positivas (MPO<sup>+</sup>) em vermelho, marcação de IL-10R1 em verde e o núcleo (DAPI; azul). As setas indicam neutrófilos expressando MPO e IL-10R1. As imagens foram realizadas em microscópio de fluorescência Colibri. Barra de escala 100μm.



## 4.5 O tratamento com talidomida induz o aumento da expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos circulantes de pacientes ENH

O tratamento de escolha para ENH é feito pelo uso de talidomida (Polycarpou *et al.*,2017). Para analisarmos o efeito do tratamento com talidomida em relação à expressão do receptor IL-10R1. Realizamos um acompanhamento longitudinal por duas semanas com 7 pacientes ENH tratados com talidomida. Nossos dados revelaram que a expressão de IL-10R1 foi aumentada ao longo das semanas (Figura 17 A). Observamos que o tratamento com o fármaco aumenta tanto os níveis de expressão quanto a frequência de células IL-10R1+ (Figuras 17B e C). Além disso, também analisamos o efeito no tratamento com talidomida na produção de IL-10 sistemicamente, para isso utilizamos soros de pacientes ENH antes do início do tratamento e após 7 dias de tratamento (n=11) (Figura 17D). Nossos dados demonstraram que o tratamento com a talidomida reduz significativamente os níveis séricos de IL-10, associamos esse achado a um possível consumo desta interleucina pelos neutrófilos que expressam o complexo IL-10R na circulação.



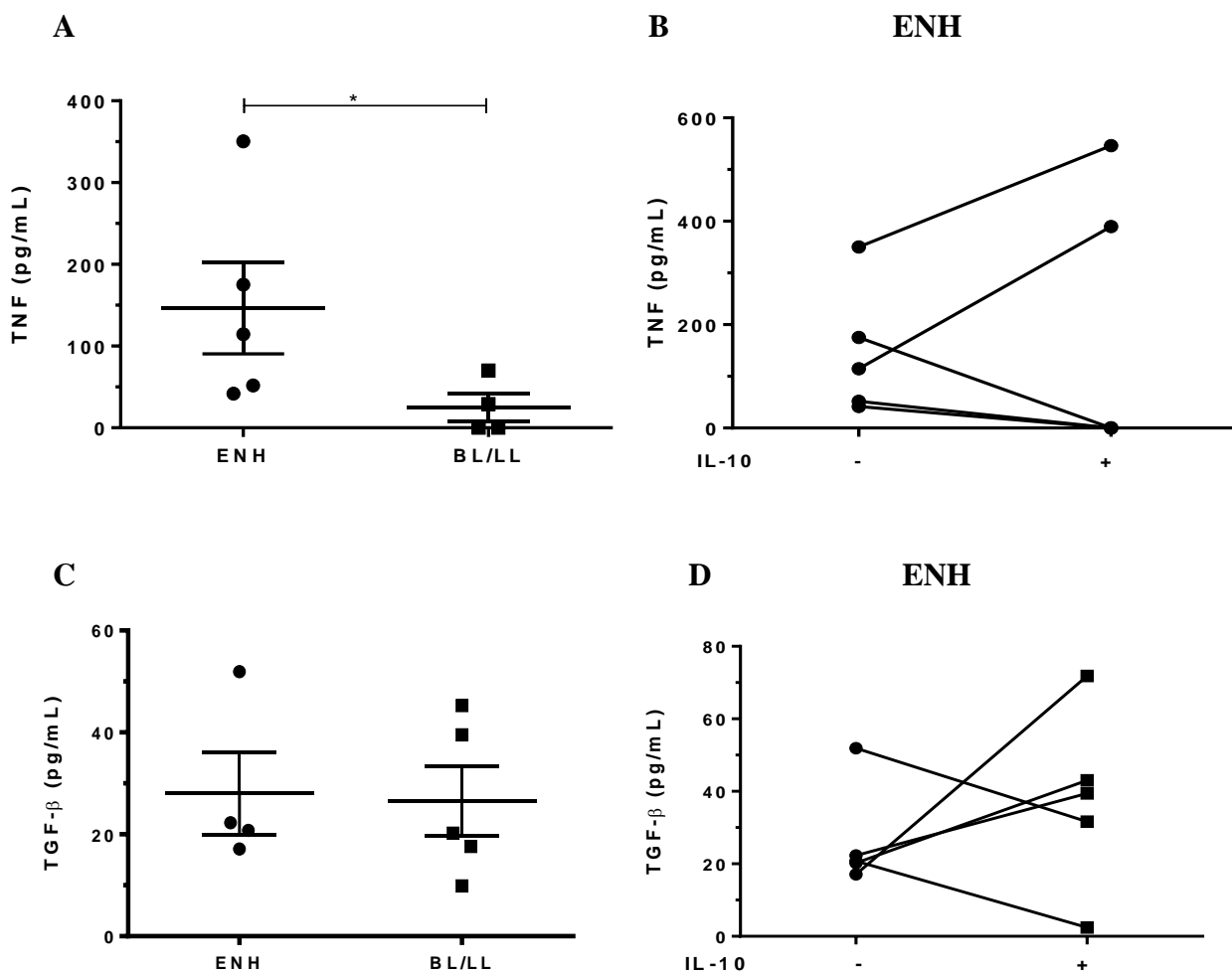


**Figura 17: Expressão de IL-10R1 em neutrófilos circulantes de pacientes ENH durante tratamento com a talidomida e efeito da talidomida nos níveis séricos de IL-10. (A)** Histogramas representativos da expressão de IL-10R1 em dois pacientes ENH (D0, antes do tratamento; D7, 7 dias após o início do tratamento; e D14, 14 dias após o início do tratamento com talidomida). **(B)** e **(C)** Gráficos da média do MFI e frequência de células IL-10R1+. Cada ponto representa um paciente (n=5). **(D)** liberação de IL-10 no soro de pacientes ENH (n=11) (\*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001; teste de Kurskal-Wallis).

#### 4.6 IL-10 modula a produção espontânea de citocinas em neutrófilos ENH

Estudos feitos pelo nosso grupo demonstraram que pacientes ENH produzem altos níveis séricos de TNF e IL-1 $\beta$  (Sarno *et al.*,1991). O objetivo deste experimento foi avaliar a capacidade espontânea de neutrófilos de pacientes ENH e BL/LL em produzirem citocinas e quimiocinas, observando também se a IL-10 modularia essa expressão, uma vez que os neutrófilos ENH expressam o complexo IL-10R. Para isso, purificamos neutrófilos de sangue periférico de pacientes ENH e BL/LL e incubamos em estufa por 24 horas em meio completo sem estímulo. Em paralelo, em alguns poços adicionamos IL-10 recombinante. Os nossos

resultados demonstraram que neutrófilos de pacientes ENH produzem espontaneamente TNF, enquanto neutrófilos BL/L não produzem (Figura 18A). Além da produção de TNF, também observamos a responsividade destes neutrófilos a IL-10, pois a adição de IL-10 nas culturas modulou negativamente esta citocina em 3 dos 5 pacientes analisados (Figura 18B). Em relação à produção de TGF $\beta$ -1, observamos que neutrófilos de pacientes ENH e de BL/LL produzem níveis baixos desta citocina não havendo diferença entre os dois grupos (Figura 18C), por outro a adição de IL-10 recombinante aumentou a produção desta citocina em 3 dos 5 pacientes acometidos por ENH analisados (Figura 18D).

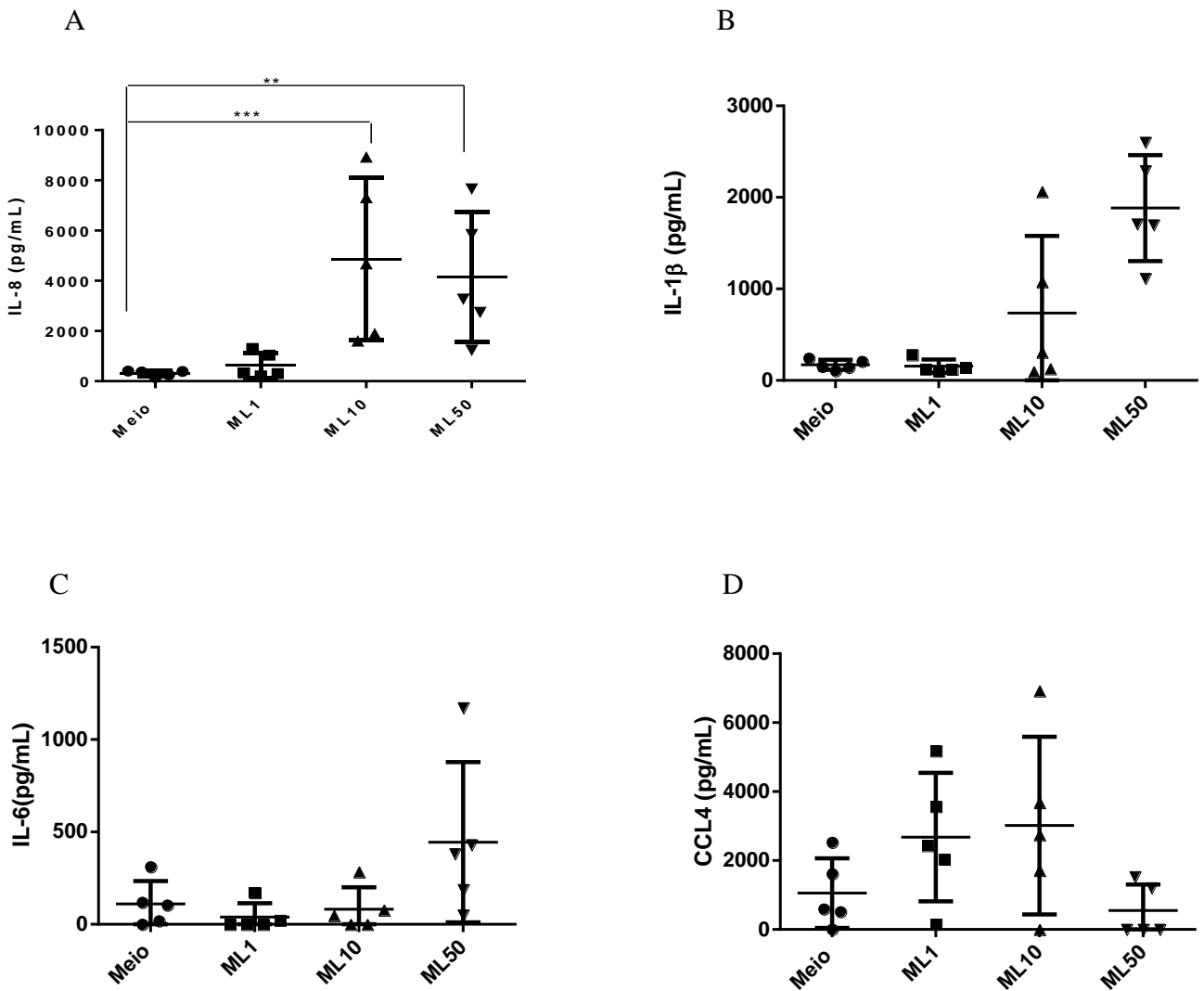


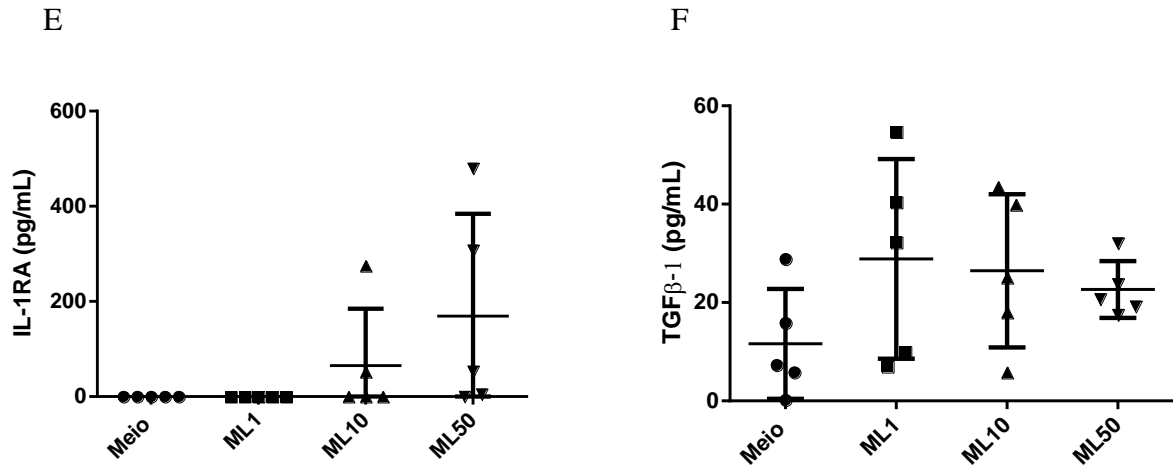
**Figura 18: Efeito da IL-10 na produção espontânea de TNF, IL-1 $\beta$  e TGF $\beta$ -1 em culturas de neutrófilos.** Neutrófilos ( $3 \times 10^6$  células totais) de pacientes ENH (n=5) ou controle multibacilar (n=5) foram ressuspensos em meio completo e tratados ou não com 20 ng/mL de IL-10 por 24 h. O sobrenadante foi coletado para análise de TNF, IL-1 $\beta$  e TGF $\beta$ -1 por ELISA. Cada ponto representa um paciente, e as barras horizontais representam as médias  $\pm$  erro padrão.



#### 4.7 Neutr3filos de doadores sadios produzem citocinas e quimiocinas em resposta a est3mulos com *M. leprae*

Apesar dos in3meros estudos recentes, o papel dos neutr3filos durante o ENH ainda n3o est3 claro. Desta forma, para ampliarmos nosso entendimento a respeito das citocinas e quimiocinas produzidas pelos neutr3filos em resposta ao *M. leprae*, os neutr3filos de doadores sadios foram estimulados com diferentes concentra33es de *M. leprae irradiado* (1, 10, 50 $\mu$ g/mL). Nossas an3lises demonstraram que os neutr3filos produzem IL-8, IL-1 $\beta$ , MIP1- $\beta$  (CCL4), IL-1RA e TGF $\beta$ -1 em resposta ao est3mulo com *M. Leprae*, e no caso da IL-8 essa produ33o foi significativa e dose-resposta (Figura 19 A, B, C, D, E e F).





**Figura 19: Produção de IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP1- $\beta$  (CCL4), IL-1RA e TGF $\beta$ -1 em neutrófilos de doadores sadios estimulados com *M. leprae*.** Neutrófilos ( $3 \times 10^6$  células totais) foram cultivados com concentrações crescentes (1, 10 e 50  $\mu\text{g/mL}$ ) de *M. leprae* (ML) por 24 horas (n=5). O sobrenadante foi coletado para análise de IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL4 e IL-1RA e TGF $\beta$ -1 por ELISA. Cada ponto representa um paciente, e as barras horizontais representam as médias  $\pm$  erro padrão. (\* P < 0,05; \*\* P < 0,01; ANOVA).

#### 4.8 IL-10 modula a produção de citocinas induzidas pelo *M. leprae* em neutrófilos

Anteriormente analisamos a capacidade do *M. leprae* em induzir citocinas e quimiocinas em neutrófilos, a IL-10 possui ação em inibir a produção de citocinas em diversos tipos celulares. Neutrófilos de doadores sadios por sua vez, não respondem a IL-10 devido à ausência da cadeia IL-10R1 do complexo IL-10R. Porém, estudos demonstram que a incubação destes neutrófilos com LPS ou IL-4 por 4 horas induz a síntese *de novo* de IL-10R1 tornando-os responsivos a IL-10 (Bazzoni et al., 2010). Neste contexto, avaliamos se neutrófilos incubados por 4 horas com *M. leprae* sintetizariam IL-10R1, tornando-os responsivos a IL-10. Para isso, incubamos neutrófilos de doadores sadios com *M. leprae* por 4 horas e depois adicionamos IL-10 para avaliar a produção de IL-8, IL-1 $\beta$ , MIP1- $\beta$ , TGF $\beta$ -1, IL-6 e IL-1RA. Nossos resultados demonstram que a adição de IL-10 nas culturas modulou negativamente a produção de quimiocinas e citocinas IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6, CCL4 e IL-1RA (Figura 20 A, B, C, D e E). Já em relação ao TGF $\beta$ -1, observamos que a IL-10 induziu a produção desta citocina em neutrófilos (Fig.20 F).

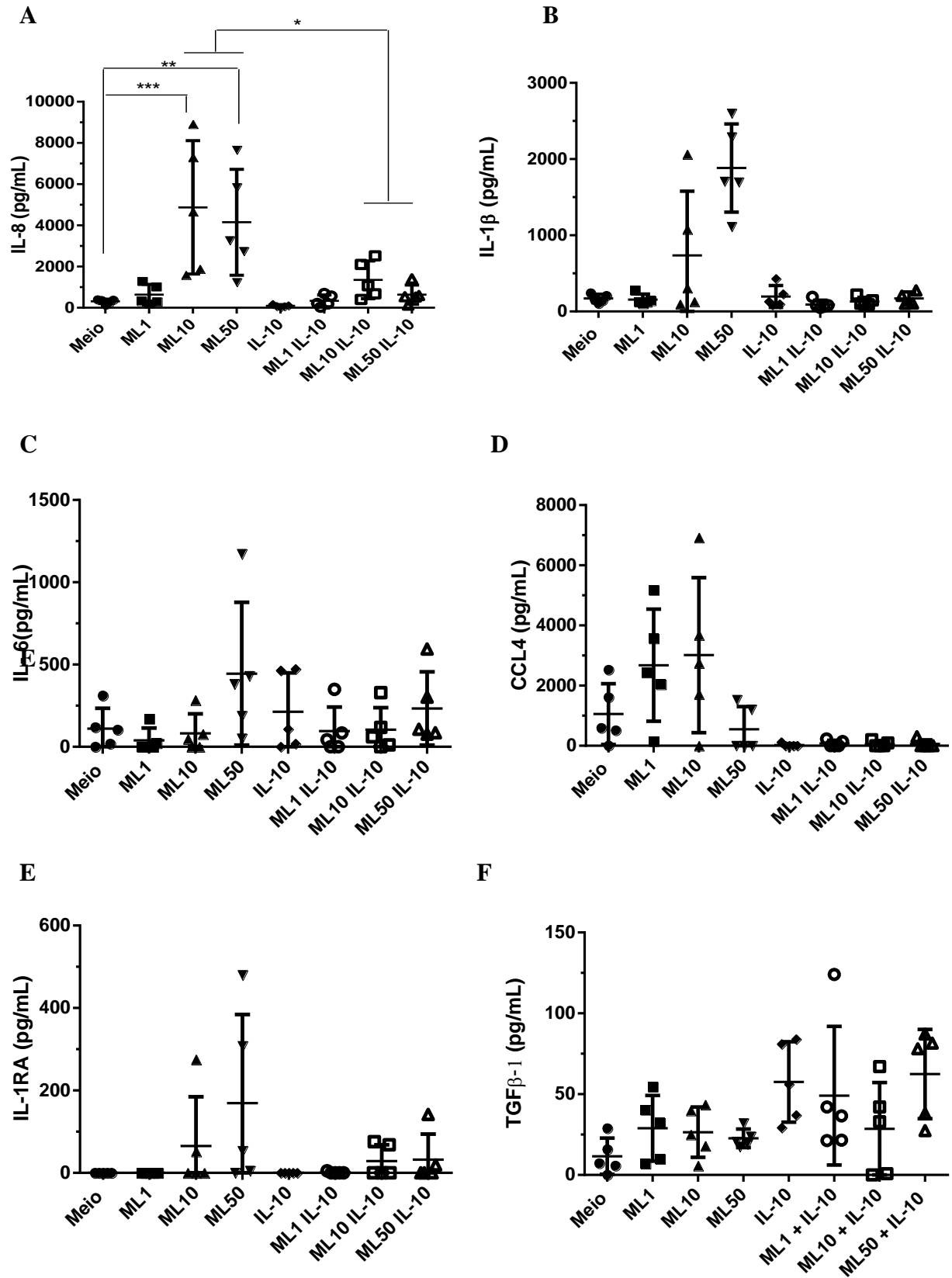


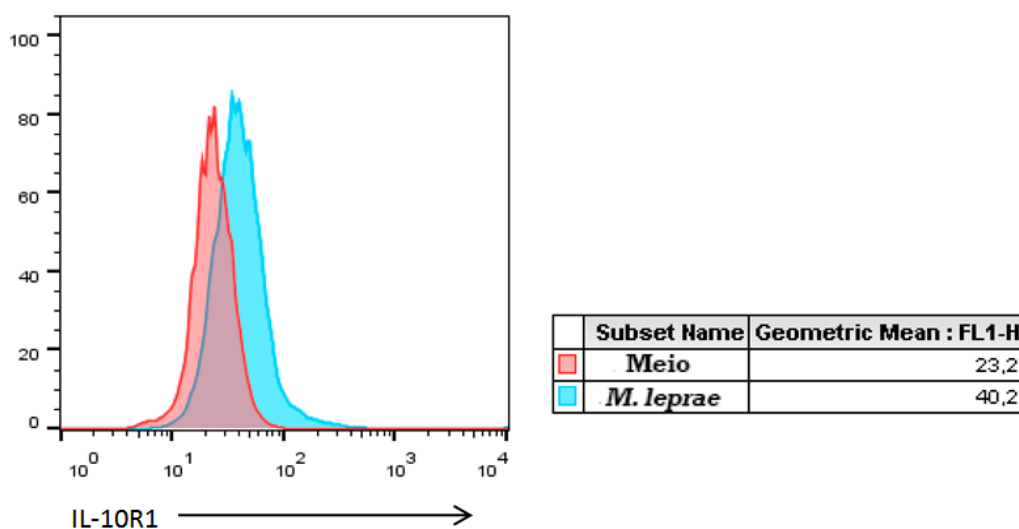
Figura 20: Efeito da IL-10 na produção de IL-8, MIP1- $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-1RA e TGF $\beta$ -1 em culturas de neutrófilos estimuladas com *M. leprae*. Neutrófilos de doadores saudáveis (3 x

10<sup>6</sup> células totais) foram cultivados com concentrações crescentes (1, 10 e 50 µg/mL) de *M. leprae* (ML) por 4 horas, e após esse tempo foi adicionado 20 ng/mL de IL-10 nas culturas (n=5). Após a incubação por 24 horas, os sobrenadantes foram coletados para análise de IL-8, IL-1β, IL-6, CCL4, IL-1RA e TGF-β1 por ELISA. Cada ponto representa um paciente, e as barras horizontais representam as médias ± erro padrão. (\* P < 0,05; \*\* P < 0,01; ANOVA)

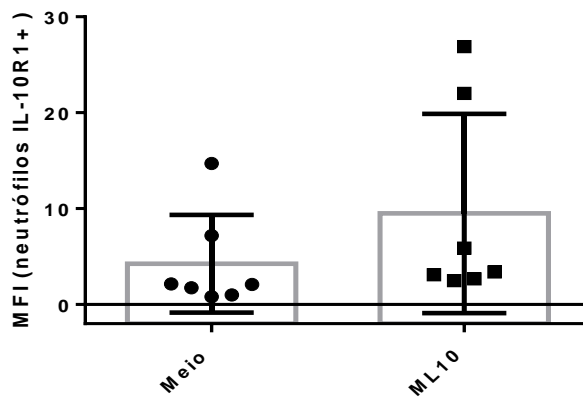
#### 4.9 *M. leprae* induz a expressão de IL-10R1 em neutrófilos sadios

Demonstramos neste trabalho que neutrófilos de pacientes ENH expressam o receptor IL-10R1, sendo a expressão deste receptor indispensável para a responsividade a IL-10, corroborando com os dados já descritos na literatura. Além disso também demonstramos sua funcionalidade pela modulação de citocinas produzidas em resposta ao *M. leprae*. Nossa hipótese é de que o *M. leprae* induz a expressão do receptor IL-10R1 em neutrófilos após 4 horas de estímulo, tornando estes neutrófilos prontamente responsivos a IL-10. Para testarmos nossa hipótese estimulamos neutrófilos de doadores sadios com 10µg/mL de *M. leprae* irradiado por 4 horas. Nossas análises de citometria de fluxo demonstraram, assim como resultados descritos anteriormente, que os neutrófilos de doadores sadios não expressam o receptor IL-10R1, porém os neutrófilos em cultura sem estímulo adquirem espontaneamente a expressão do receptor IL-10R1 (Figura 21 A) (Crepaldi *et al.*,2001). Nossos resultados demonstram que os neutrófilos estimulados com *M. leprae* irradiado por 4 horas expressam níveis ainda maiores de IL-10R1 em sua superfície (Figura 21 A e B).

A



B



**Figura 21: *M. leprae* induz a expressão de IL-10R1 na superfície de neutrófilos de doadores sadios.** (A) Histograma representativo de doador sadio em meio de cultura sem estímulo e estimulado por 4 horas com 10  $\mu\text{g/mL}$  de *M. leprae* irradiado, os neutrófilos foram purificados e marcados para análise da expressão de IL-10R1. (B) MFI dos neutrófilos de doadores sadios ( $3 \times 10^6$  células totais) que foram cultivados em meio sem estímulo e com 10  $\mu\text{g/mL}$  de *M. leprae* (ML) por 4 horas, após as 4 horas as células foram marcadas para análises por citometria da expressão de IL-10R1 (n=7).

## 5. DISCUSSÃO

Neutrófilos atuam como sensores biológicos, pois alterações no microambiente levam a alterações nas suas moléculas de superfície passando a expressar antígenos que comumente não expressariam (Elghetany *et al.*, 2002). Apesar disso, durante muito tempo os neutrófilos foram definidos como uma população homogênea, porém estudos recentes demonstraram a presença de subpopulações de neutrófilos e sugerem essa heterogeneidade como uma importante característica na imunopatogênese de doenças, como no câncer e em doenças crônicas infecciosas e não-infecciosas como no lúpus eritematoso sistêmico. (Nget *et al.*, 2019).

Em condições normais os neutrófilos não expressam a cadeia IL-10R1, consequentemente não respondem a IL-10. Porém estudos realizados com neutrófilos de pacientes sépticos demonstraram que estas células são capazes de adquirir a capacidade de expressar o receptor IL-10R1, e essa expressão é corroborada com a responsividade a IL-10.

Neste trabalho identificamos a presença de uma subpopulação de neutrófilos que expressam o receptor IL-10R1 durante o ENH. Nossos resultados demonstram que neutrófilos do sangue periférico de pacientes com ENH expressam níveis elevados do receptor IL-10R1 quando comparados com neutrófilos de pacientes RR, BL/LL, e doadores sadios. Além dos neutrófilos presentes na circulação periférica, analisamos os neutrófilos presentes nas lesões de pacientes ENH, uma vez que representam um marco histológico do ENH (Polycarpou *et al.*, 2017). Nossas análises de cortes histológicos por imunofluorescência demonstraram a expressão de IL-10R1 em neutrófilos presentes nas lesões de pele de pacientes ENH antes do tratamento com a talidomida.

O achado de um biomarcador permite identificar de forma automatizada uma condição patológica e mensurar sua severidade. A busca por biomarcadores é uma área promissora na hanseníase, principalmente no ENH, já que permitiriam um rápido diagnóstico a fim de prevenir os danos neurais ocasionados por esta reação, uma vez que o “padrão-ouro” de diagnóstico do ENH é feito pela análise de biópsias de lesão de pele, que por sua demora em torno de um mês até um laudo conclusivo. Nossos resultados indicam que a expressão de IL-10R1 em neutrófilos de pacientes ENH pode ser um promissor biomarcador, capaz de diferenciar o ENH das formas clínicas BL/LL e RR da hanseníase. Esses achados poderiam ser replicados em cortes maiores de pacientes com hanseníase, o que poderia validar a expressão de IL-10R1 como biomarcador de ENH. Além disso, nos permite um melhor entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no ENH. Apesar de muitos estudos o fator chave para o desencadeamento da reação ainda não está claro.

O fármaco de escolha para o tratamento do ENH é a talidomida, sendo extremamente eficaz no tratamento (Kamath *et al.*,2014). Possui eficácia estimada de cerca de 70-90% nos pacientes ENH que exibem uma recuperação completa com diminuição no número de nódulos e regressão do infiltrado inflamatório, após poucos dias de tratamento (Mendes *et al.*,2017). A talidomida vem sendo utilizada no tratamento de outras patologias imunomediadas como o lúpus eritematoso sistêmico, mieloma múltiplo e a doença de Crohn. Um fármaco que apresenta propriedades antiinflamatórias e imunomoduladoras, que apesar de sua destacável eficácia, ainda apresenta mecanismo de ação desconhecido (Millrine e kishimoto., 2017).

Em relação aos estudos com biomarcados, uma das características desejáveis para um biomarcador é que o tratamento modifique sua expressão. Um dos nossos objetivos foi avaliar um possível efeito modulatório do tratamento com a talidomida em relação à expressão do receptor IL-10R1 em neutrófilos. Para isto realizamos um acompanhamento longitudinal de pacientes ENH durante o tratamento com a talidomida. Nossos resultados demonstraram que o tratamento aumenta a expressão do receptor IL-10R1 em neutrófilos circulantes, assim como a frequência de neutrófilos IL-10R1+.

Os efeitos biológicos da IL-10 se iniciam pela ligação da IL-10 aos receptores IL-10R1 e IL-10R2 (Kotenko *et al.*,1997). Estudos anteriores demonstraram que pacientes acometidos pelo ENH apresentaram níveis elevados de IL-10 no soro (Moubasher *et al.* 1998; Madan *et al.* 2011). No presente estudo observamos a expressão de IL-10R1 em neutrófilos de pacientes ENH e o aumento da expressão induzida pelo tratamento com a talidomida. A fim de avaliar o efeito da expressão de IL-10R1 em relação aos níveis de IL-10, analisamos os níveis de IL-10 no soro de pacientes com ENH antes do tratamento com a talidomida e após 7 dias de tratamento. Nossos dados em relação aos níveis séricos de IL-10 em pacientes ENH antes do tratamento corroboram a literatura, uma vez que observamos níveis elevados de IL-10. Porém, em relação ao tratamento com a talidomida, observamos uma significativa redução nos níveis séricos de IL-10 em pacientes ENH após 7 dias de tratamento.

Nossa hipótese é de que essa redução ocorra pelo consumo de IL-10 pelos neutrófilos, uma vez que o tratamento aumenta a expressão do receptor IL-10R1 na superfície dos neutrófilos de pacientes com ENH. Além da dosagem de IL-10 no soro, os níveis de HO-1 (Heme oxigenase-1) também foram mensurados, os resultados demonstram que antes do tratamento com a talidomida os níveis de HO-1 estão aumentados no soro de pacientes com ENH (Prata *et al.*,2018). Como perspectiva futura dosaremos os níveis de HO-1 no soro de pacientes após o tratamento com a talidomida e também utilizaremos extrato de proteína de neutrófilos de pacientes com ENH antes e após o 7 dias de tratamento para avaliarmos os

níveis de expressão de HO-1 por Western blotting e desta forma reforçar nossa hipótese de consumo de IL-10 pelos neutrófilos.

Em relação à expressão de IL-10 em lesões de pacientes com ENH, análises de expressão gênica demonstram que antes do tratamento os pacientes apresentam aumento na expressão de RNA mensageiro para IL-10 (Yamamura *et al.*,1992). Porém, após o tratamento com a talidomida foi observada redução da expressão de IL-10 em lesões de pele de pacientes ENH (Moraes *et al.*,2000). Análises foram realizadas em relação aos níveis de HO-1 em fragmentos de pele de pacientes antes do tratamento com talidomida e 7 dias após o tratamento, esses resultados demonstraram que os pacientes antes do tratamento expressam níveis elevados de ENH, porém o tratamento com a talidomida reduz os níveis dessa expressão (Prata *et al.*,2018). Como já descrito na literatura, o tratamento com a talidomida reduz a infiltração de neutrófilos nas lesões. Neste contexto, a redução dos níveis de HO-1 na lesão de pacientes 7 dias após o tratamento pode estar associada com a falta de neutrófilos no sítio da lesão em resultado ao tratamento com a talidomida.

Recentemente nosso grupo vem demonstrando a participação dos neutrófilos durante o ENH, como a expressão de CD64 drasticamente aumentada na superfície de neutrófilos de pacientes com ENH. Este estudo aponta o CD64 como um promissor biomarcador para o ENH, inclusive como um marcador de gravidade, uma vez que pacientes que possuíam altos níveis de CD64 na superfície dos neutrófilos circulantes apresentaram uma maior gravidade clínica, como febre e sintomas sistêmicos (Schmitz *et al.*,2016).

Outro estudo realizado pelo nosso grupo foi em relação a PTX3, proteína presente no grânulo secundário de neutrófilos, induzida por sinais inflamatórios como TNF e IL-1 $\beta$ . Nosso grupo demonstrou que pacientes MB (BL/LL) apresentam níveis elevados de PTX3 no soro, e esses se mantiveram elevados em pacientes que desenvolveram ENH. Em contraste, em pacientes BL que desenvolveram RR apresentaram baixos níveis de PTX3 no soro. Sendo assim, este trabalho sugere a PTX3 como um biomarcador preditivo para o ENH (Mendes *et al.*,2017). Porém, ao contrário da IL-10R1 o tratamento com a talidomida reduz os níveis de expressão de CD64 na superfície de neutrófilos (Schmitz *et al.*,2016) e reduz os níveis séricos de PTX3 em pacientes ENH (Mendes *et al.*,2017). Análises de correlação demonstraram que a expressão de CD64 na superfície de neutrófilos foi correlativamente positiva com os níveis séricos de PTX3, sugerindo essa relação CD64/PTX3 envolvida na inflamação exacerbada em pacientes ENH (Mendes *et al.*,2017).



Neste contexto, analisamos se haveria correlação entre a expressão de CD64 e IL-10R1 em neutrófilos de pacientes com ENH. Nossas análises demonstraram uma forte correlação positiva entre a expressão de CD64 e IL-10R1 ( $r = 0,9429$ ;  $P = 0,0167$ ) (Pacheco *et al.*, 2019 Em preparação). O CD64 é um marcador de ativação neutrofílica, e observamos o aumento de sua expressão durante o processo inflamatório gerado pelo ENH. Essa correlação positiva entre os níveis de CD64 e IL-10R1 nos sugere que durante o ENH os neutrófilos ativados expressam assim como o CD64, o IL-10R1, como forma de controle da resposta inflamatória. Porém, durante o tratamento com a talidomida observamos o aumento de IL-10R1 e diminuição de CD64, este dado nos sugere que possivelmente os efeitos antiinflamatórios da talidomida ocorram pela via IL-10/IL-10R. Apesar de inúmeros estudos ainda não está claro se os neutrófilos iniciam a reação ENH, desta forma o envolvimento dos neutrófilos durante o ENH ainda precisa ser elucidado.

Neste trabalho avaliamos a capacidade espontânea de neutrófilos de pacientes ENH em produzirem TNF *ex vivo*, sendo TNF uma citocina associada com episódios de ENH, encontrada em níveis elevados no soro de pacientes ENH sem tratamento (Sampaio *et al.*, 1993). Em contrapartida, a supressão de TNF resulta em uma melhora clínica dos pacientes (Sampaio *et al.*, 1998).

Nossos resultados demonstraram a produção espontânea de TNF por neutrófilos ENH, o que não foi observado em neutrófilos de pacientes BL/LL, corroborando a função dos neutrófilos como célula chave para a imunopatogênese do ENH. Como forma de avaliarmos a funcionalidade do receptor, analisamos o efeito modulatório da IL-10 em relação à produção espontânea de TNF em neutrófilos de pacientes ENH. Ressaltando que os neutrófilos de pacientes ENH expressam as duas cadeias do complexo IL-10R como demonstrado nos resultados anteriores. Observamos que a adição da IL-10 nas culturas de neutrófilos ENH diminuiu a produção de TNF em 3 dos 5 pacientes analisados.

Outra citocina analisada foi o TGF $\beta$ -1, nossos resultados demonstram que os pacientes BL/LL e ENH produzem espontaneamente TGF $\beta$ -1, não havendo diferença entre os dois grupos. Porém, em relação aos neutrófilos de pacientes ENH, quando a IL-10 é adicionada às culturas, observamos a capacidade regulatória da IL-10, uma vez que ocorre o aumento na produção de TGF $\beta$ -1 em 3 dos 5 pacientes analisados. Com estes resultados corroboramos que a expressão de IL-10R1 pela responsividade dos neutrófilos ENH a IL-10 e destacamos a IL-10/IL-10R como um potencial alvo para o desenvolvimento de novas terapias para o ENH.

Nas últimas décadas, estudos apontam novas funções para os neutrófilos em diversas condições patológicas, com ênfase na sua capacidade de produzir uma variedade de citocinas, podendo essa produção ser desencadeada por diversas condições. (Tecchio *et al.*, 2014). Em relação à hanseníase, as citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos e células de Schwann em resposta ao *M. leprae* já estão caracterizadas. Porém, em relação aos neutrófilos, somente a IL-8 e o TNF já haviam sido descritas como secretadas por neutrófilos isolados de pacientes e responsivos ao *M. leprae in vitro* (Oliveria *et al.*,1999).

Neste trabalho avaliamos a capacidade do *M. leprae* em induzir a produção de citocinas e quimiocinas em neutrófilos de doadores saudáveis. Nossos resultados mostraram que neutrófilos de doadores saudáveis produzem mediadores pró inflamatórios (IL-8,IL-1 $\beta$ ,IL-6,MIP1- $\beta$ ,IL-1RA), fatores críticos para a inflamação sistêmica associada ao ENH (Polycarpou *et al.* 2017). A adição da IL-10 nas culturas desencadeou a redução na produção destes fatores pró-inflamatórios. Além disso, também observamos que os neutrófilos de doadores saudáveis produzem TGF $\beta$ -1 em resposta ao *M. leprae*. Porém, em relação ao TGF $\beta$ -1, ao contrário dos mediadores pró-inflamatórios, observamos um efeito modulatório positivo quando adicionamos a IL-10 nas culturas. Esses resultados reforçam estudos prévios sobre o papel da IL-10 no ENH, evidenciando a importância da expressão do receptor IL-10R1 para a responsividade dos neutrófilos a IL-10 (Crepaldi *et al.*,2001).

A expressão de IL-10R1 em neutrófilos foi observada em ensaios *in vitro* através do estímulo de neutrófilos com IL-4, tornando os neutrófilos responsivos a IL-10 em termos de indução da fosforilação da tirosina Stat3 (Crepaldi *et al.*, 2002). Outro fator capaz de induzir a expressão de IL-10R1 em neutrófilos é o LPS. Análises de Western Blotting demonstraram a expressão de IL-10R1 induzida pelo LPS e sua funcionalidade foi corroborada pela expressão de HO-1 (Cassatella *et al.*, 2005).

Para elucidar os mecanismos pelos quais os neutrófilos adquirem a capacidade de expressar IL-10R1 e conseqüentemente se tornarem responsivos a IL-10, os autores analisaram o efeito do uso de um inibidor de síntese proteica, o cicloheximida (CHX). Através destas análises observaram que na presença do inibidor, o neutrófilo perde a capacidade de expressar IL-10R1 em sua superfície (Crepaldi *et al.*, 2001). Também observaram a perda do efeito inibitório da IL-10 em relação a produção de TNF induzida por LPS, em análises de Northern blotting (Cassatella *et al.*,2005). Esses estudos demonstraram que a expressão de IL-10R1 em neutrófilos ocorre *via synthesis de novo*, precisando de 4 horas para que a formação do receptor ocorra.

Em condições inflamatórias como a sepse, os neutrófilos expressam constitutivamente o IL-10R1 (Tamassia *et al.*,2008). Nossa hipótese é de que o *M. leprae* induz expressão do receptor IL-10R1 em neutrófilos humanos, ou seja, o ambiente inflamatório ocasionado em resposta ao *M. leprae*, assim como na sepse, poderia estar levando à expressão do receptor em neutrófilos. Para testar nossa hipótese, realizamos ensaios *in vitro* onde estimulamos neutrófilos de doadores sadios com 10µg/mL de *M. leprae* irradiado. Nossos resultados demonstraram que neutrófilos sadios, quando colocados em cultura em meio sem estímulo, adquirem espontaneamente a expressão do receptor IL-10R1, assim como já descrito na literatura (Bazzoni *et al*, 2010). Por outro lado a presença do *M. leprae* na cultura aumenta ainda mais a expressão do receptor IL-10R1 na superfície dos neutrófilos.

## 6. CONCLUSÃO

Com isso, concluímos este trabalho demonstrando que neutrófilos passam a expressar o receptor IL-10R1 durante o ENH, e que o *M. leprae* é capaz de induzir a expressão do receptor IL-10R1. Nosso trabalho destaca os neutrófilos como uma célula-chave para a inflamação sistêmica associada ao ENH, uma vez que neutrófilos de pacientes ENH produzem espontaneamente citocinas como TNF, ao contrário de neutrófilos isolados de pacientes não reacionais. Além disso, neutrófilos de doadores sadios produzem citocinas pró-inflamatórias em resposta ao *M. leprae*. Além disso, demonstramos a responsividade dos neutrófilos ENH a IL-10, com isso apontamos a via IL-10 como um alvo molecular para estudos sobre a reação e como um alvo para futuros protocolos de intervenção.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bijjiga E, Martino AT. Interleukin 10 (IL-10) Regulatory Cytokine and its Clinical Consequences. *J Clin Cell Immunol* (2013) S1: 007.
2. Bratschi MW, Steinmann P, Wickende N A, Gillis TP. Current knowledge on *Mycobacterium leprae* transmission: a systematic literature review. *Lepr Rev* (2015) 86:142–55.
3. Brightbill HD, Libraty DH, Krutzik SR, Yang RB, Belisle JT, Bleharski JR. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. (1999) ;285:732-6.
4. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* (2004) 303:1532–5. [10.1126/science.1092385](https://doi.org/10.1126/science.1092385)
5. Britton WJ, Lockwood DNJ. Leprosy. *Lancet*... 1209±1219. (2004). PMID: 15081655
6. Brown, K. A., Brain, S. D., Pearson, J. D., Edgeworth, J. D., Lewis, S. M. AND Treacher, D. F. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *Lancet*. (2006). 368:157.
7. Cassatella MA, Tamassia N, Crepaldi L. Lipopolysaccharide primes neutrophils for a rapid response to IL-10, *Eur. J. Immunol.*, (2005), vol. 35pg. 1877
8. Cassatella, M. A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.* (1999). 73:369
9. Colston MJ. Growth of *Mycobacterium leprae* and *M. marinum* in congenitally athymic (nude) mice. *Nature*. (1976) .262:736–741

10. Crepaldi L, Gasperini S, Lapinet JA. Up-regulation of IL-10R1 expression is required to render human neutrophils fully responsive to IL-10, *J. Immunol.*, (2001), vol. 167pg.2312
  
11. Crepaldi.L, Silveri.L, Calzetti.F, Pinaridi.C, Cassatella. MA. Molecular basis of the synergistic production of IL-1 receptor antagonist by human neutrophils stimulated with IL-4 and IL-10, *Int. Immunol.*, (2002) vol. 14 pg. 1145
  
12. Crepaldi, L., Gasperini, S., Lapinet, J. A., Calzetti, F., Pinaridi, C., Liu, Y., Zurawski, S. Up-regulation of IL-10R1 expression is required to render human neutrophils fully responsive to IL-10. *J. Immunol.* (2001). 167 : 2312–2322.
  
13. De Freitas MR, Said G. Leprous neuropathy. *Handb Clin Neurol.* (2013) ;115:499-514.
  
14. De Lima CS, Marques MA, Debie AS, Almeida EC, Silva CA, Brennan PJ. Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) of *Mycobacterium leprae* is expressed during infection and enhances bacterial adherence to epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* (2009) 292:162–9.10.1111/j.1574-6968.2009.01488.
  
15. DE Mangel C, Britton WJ. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol.* (2000) ;78:318–24. 18.
  
16. EIDT, LM. Breve história da hanseníase: sua expansão do mundo para as Américas, o Brasil e o Rio Grande do Sul e sua trajetória na saúde pública brasileira. *Saúde e Sociedade* 2004; v.13, n.2, p.76-88.
  
17. Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: a critical review. *Blood Cells Mol Dis.* abril de( 2002) ;28(2):260–74.

18. BAZZONI F, TAMASSIA N, Marzia, Rossato, Marco A. Cassatella. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: Lessons from neutrophils. (2010)
19. Fridlender ZG, Sun J, Kim S, Kapoor V, Cheng G, Ling L. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF- $\beta$ : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* (2009) 16:183–94. 10.1016/j.ccr.2009.06.017
20. Garcia JRL. Entre a loucura e a hanseníase: interfaces históricas das práticas e políticas instituídas. *Hansenologia Internationalis*, (2001) [acesso em 24 de Maio ]
21. Gohman-yahr M, Rodriguez-OCHOA G, Aranzazu N, Convit J. Polymorphonuclear activation in leprosy. I. Spontaneous and endotoxin-stimulated reduction of nitroblue tetrazolium: effects of serum and plasma on endotoxin-induced activation. *Clin Exp Immunol* (1975) 20(2):257–64.
22. Goodless D, Ramos-caro FA, Flowers F. Reactional states in Hansen’s disease: practical aspects of emergency management. *South Med J* (1991);84:237-41.
23. Helmy HS, Pearson JM, Waters MF. Treatment of moderately severe erythema nodosum leprosum with clofazimine--a controlled trial. *Lepr Rev.* (1971);42:167-77.
24. Hussain T. Leprosy and tuberculosis: an insight-review. *Crit Rev Microbiol.* (2007) ;33(1):15–66.
25. Hyun Y-M, Sumagin R, Sarangi PP, Lomakina E, overstreet MG, Baker CM. Uropod elongation is a common final step in leukocyte extravasation through inflamed vessels. *J Exp Med.* (2012) 209:1349–62. 10.1084/jem.20111426.

26. Kahawita IP, Walker SL, Lockwood, Diana NJ. Leprosy type 1 reactions and erythema nodosum leprosum. *An Bras Dermatol.* (2008) ;83(1):75-82.
27. Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol.* (2014).;71(4):795–803. 10.1016/j.jaad.2014.03.034.
28. Kasten KR, Muenzer JT, Caldwell CC. Neutrophils are significant producers of IL-10 during sepsis. *Biochem Biophys Res Commun.*(2010) ;393(1):28–31. doi:10.1016/j.bbrc.2010.01.066.
29. Khadge S, Banu S, Bobosha K, Van der ploeg-van schip JJ, Goulart IM, Thapa P. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh, Brazil, Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis* (2015) 15:477.10.1186/s12879-015-1128-0
30. Kolenko, S. V., C. D. Crause, L. S. Izotova, B. P. Pollack, W. WU, AND S. PESTKA.. Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin- 10 receptor complex. (1997) *EMBO J.* 16:5894.
31. Kolenko, S. V., L. S. Izotova, B. P. Pollack, G. Muthukumar, K. Pauku, O. Silvennoinen, J. H. IHLE, AND S. Pestka Other kinases can substitute for Jak2 in signal transduction by interferon- $\gamma$ . *J. Biol. Chem.* 271:17174.
32. Lary JM, Daniel KL, Erickson JD, Roberts HE, Moore CA. The return of thalidomide: can birth defects be prevented? *Drug Saf.* (1999) ;21:161-9.
33. Lockwood DN, Colston MJ, Khanolkar-young SR. The detection of *Mycobacterium leprae* protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. *Am J Trop Med Hyg.* (2002) ;66:409-15.



34. Mabalay MC, HELWIG EB, TOLENTINO JG, BINFORD CH. The histopathology and histochemistry of erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr* (1965) 33:28–49.
35. Madan NK, Agarwal K, Chander R. Serum cytokine profile in leprosy and its correlation with clinico-histopathological profile. *Lepr Rev.* (2011) ;82(4):371–82
36. Massimo Fioranelli and Roccia Maria Grazia. Twenty-five years of studies and trials for the therapeutic application of IL-10 immunomodulating properties. From high doses administration to low dose medicine new paradigm. *J Integr Cardiol*, (2014): 10.15761/JIC.1000102.
37. Mendes MA, De Carvalho DS, Amadeu TP, Silva BJA, Prata RBDS, Da SILVA CO. Elevated pentraxin-3 concentrations in patients with leprosy: potential biomarker of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis.* (2017) 216:1635–43. doi: 10.1093/infdis/jix267
38. Neuman A. “Persistência da viabilidade do *Mycobacterium leprae* em pacientes do Mal de Hansen sob tratamento”. Dissertação de mestrado da pós-graduação em biologia celular e molecular (2017).
39. 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)
40. Misch EA, Berrington WR, Vary JC JR, Hawn TR. Leprosy and the human genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* (2010) ; Dec;74(4):589–620.
41. Millrine D, Kishimoto T. A Brighter Side to Thalidomide: Its potential use in immunological disorders. *Trends Mol Med.* (2017); 23(4):348-361;

42. Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C. On the origin of leprosy. *Science*. (2005); 308(5724):1040-2;
43. Moore, K. W., DE Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A., Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 2001. 19: 683–765.
44. Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int. J. Dermatol.* (1998) ;37(10):733–40
45. Naafs B. Treatment duration of reversal reaction: a reappraisal. Back to the past. *Lepr Rev* (2003);74(4):328-36
46. Nath I, Vemuri N, Reddi AL, Bharadwaj M, Brooks P, Colston MJ. Dysregulation of IL-4 expression in lepromatous leprosy patients with and without erythema nodosum leprosum. (2008)
47. Ng LG, Ostuni R, Hidalgo A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat. Rev. Immunol.* (2019) ;19(4):255–65
48. 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) 65:364–71. doi: 10.1002/jlb.65.3.364
49. Oliveira RB, Ochoa MT, Sieling PA, Rea TH, Rambukkana A, Sarno EN. Expression of Toll-like receptor 2 on human Schwann cells: a mechanism of nerve damage in leprosy. *Infect Immun* (2003);71:1427-33.
50. Pfaltzgraff RE, Ramu G. Clinical leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; (1994). p. 237-90.

51. Pacheco FP, Berto BSP, Brandão SS, Ferreira H, Rodrigues TF, Santo JS, Oliveira C, Tavares IF, Mendes MA, Duarte A, Nery A, Amadeu TP, Moraes M, Sarno EN and Schmitz V. (2019) Em preparação.
52. Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg.* (2006);74:868-79.
53. Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DN. A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. *Front Immunol.* (2017) ;8(233): 1-41
54. Rees RJW, Young DB. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy*. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; (1994). p.49-83.
55. Rotberg A. A antiga, permanente e poderosa anti-educação com a palavra “lepra” e sua frustração através de nova terminologia. (1997); 11: 26-33.
56. Sales-Marques C, Cardoso CC, Alvarado-Arnez LE, Illaramendi X, Sales AM, Hacker MA. Genetic polymorphisms of the IL6 and NOD2 genes are risk factors for inflammatory reactions in leprosy. *PLoS Negl Trop Dis.* (2017);11(7):1-16
57. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol.* (1991);84:103-8.
58. SERVIÇO NACIONAL DE LEPROLOGIA. Manual de leprologia. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Saúde, (1960).
59. Schmitz V, Prata RB DA S, Barbosa MG DE M, Mendes MA, Brandão SS, Amadeu TP, et AL. Expression of CD64 on Circulating Neutrophils Favoring Systemic Inflammatory Status in Erythema Nodosum Leprosum. Johnson C, editor. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* (2016) ;10(8):e0004955

60. Schmitz V, Prata RB, Barbosa MG, Mendes MA, Brandao 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):1-18.
61. Schmitz V, Tavares IF, Pignataro P, Machado A DE M, Pacheco F.S, Dos santos JB, et al. Neutrophils in Leprosy. *Frontiers in Immunology*. (2019);10
62. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev* (2006) 19:338–81.10.1128/CMR.19.2.338-381.2006.
63. Serviço Nacional de Lepra. Manual de leprologia. Rio de Janeiro: Departamento Nacional de Saúde, (1960).
64. Sher R, Anderson R, Glover A, Wadee AA. Polymorphonuclear cell function in the various polar types of leprosy and erythema nodosum leprosum. *Infect Immun*. (1978) 21:959–65.
65. Sheskin J. Thalidomide in treatment of lepra reactions. *Clin Pharmacol Ther* (1965); 6:303
66. Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* (1997) 159: 4772-80
67. Tadesse A, Abebe M, Bizuneh E, Mulugeta W, Aseffa A, Shannon EJ. Effect of thalidomide on the expression of TNF-alpha m-RNA and synthesis of TNF-alpha in cells from leprosy patients with reversal reaction. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. (2006) ;28:431-41.

68. Tecchio C, Micheletti A, cassatella MA. Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression. *Frontiers in Immunology*. (2014)
69. Teles RM, Moraes MO, Geraldo NT, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP. Differential TNF alpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res*. (2002); 294:355-62.
70. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signals in macrophages. *Proc Natl Acad. Sci. USA*. (1999);96:14459–63.
71. ChaitanyaM.V.,LavaniaAA,NigamaR.P,TurankarAI,SinghaI,HorobU,SenguptaAR.S,,Jadha.VC., Cortisol and proinflammatory cytokine profiles in type 1 (reversal) reactions of leprosy. (2013).
72. Vinayakumar S, Colston MJ, et al. Tumour necrosis Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol*. (1995);99:196-202.
73. Vogelsang TM. Gerhard Henrik Armauer Hansen, 1841-1912. *Int. J. Lepr*. (1978); 46(3-4): 257-332.
74. Walker SL, Balagon M, Darlong J, Doni SN, Hagge DA, Halwai V, et al. ENLIST 1: an international multi-centre cross-sectional study of the clinical features of erythema nodosum leprosum. *PLoS Negl Trop Dis* (2015) 9(9):e0004065. [journal.pntd.0004065](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004065)
75. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med*. (2011) 17:1410. [10.1038/nm.2538](https://doi.org/10.1038/nm.2538)

76. Welch DR, Schissel DJ, Howrey RP, Aeed PA. Tumor-elicited polymorphonuclear cells, in contrast to “normal” circulating polymorphonuclear cells, stimulate invasive and metastatic potentials of rat mammary adenocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. (1989) 86:5859–63. 10.1073/pnas.86.15.5859
77. World Health Organization [homepage on the Internet]. Global strategy for further reducing leprosy burden and sustaining leprosy control activities (2006-2010): Operational guidelines. [cited 2007 Dec 12]. Available from: <http://www.who.int/lep/resources/SEAGLP20062.pdf>
78. Yamamura M, Wang xh, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunological mediated tissue damage. *J Immunol*. (1992);149: 1470–75
79. Zawrotniak M, Rapala-kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) - formation and implications. *Acta Biochim Pol*. (2013) 60:277–84
80. Zeldis JB, Williams BA, Thomas SD, Elsayed ME. S.T.E.P.S. A comprehensive program for controlling and monitoring access to thalidomide. *Clin Ther* (1999) ;21:319-30.
81. Truman RW. Viable *M. leprae* as a research reagent. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacteria*. (2001); 69:1–12. 21.
82. World Health Organization. WHO recommended MDT regimens. 2012 [consultado 04 Feb 2011]. Available from <http://www.who.int/lep/mdt/regimens/en/index.html#>
83. Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2002; 35(4):365-75;

## 8. APÊNDICES E/OU ANEXOS

### 8.1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Pacientes (TCLE)



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) Pacientes

##### TÍTULO DA PESQUISA: “PAPEL DE NEUTRÓFILOS NA IMUNOPATOGÊNESE DA HANSENÍASE”

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Verônica Schmitz Pereira

TELEFONE: (21) 2562-1579

##### INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar de um estudo porque tem o diagnóstico de hanseníase. Estamos consultando você sobre a possibilidade de utilização de alguns materiais biológicos (somente pele e sangue periférico). Desta forma, este documento apresentado agora, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), tem como objetivo assegurar seus direitos como participante da pesquisa e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

##### POR QUE ESTE ESTUDO ESTA SENDO REALIZADO?

Esse estudo está sendo realizado para saber como estão os seus neutrófilos (uma célula que fica no sangue). Os neutrófilos podem ir para qualquer parte do seu corpo e ajudar no combate contra a qualquer doença. Em alguns pacientes com hanseníase os neutrófilos vão para a pele, e pretendemos investigar se os seus neutrófilos poderiam estar associados com a doença. Se você concordar serão realizados vários testes nos seus neutrófilos do sangue e da pele. Faremos também um teste genético que permitirá esclarecer porque seus neutrófilos saem do sangue para a pele.

##### QUANTAS PESSOAS PARTICIPARÃO DESTE ESTUDO?

Um total de 120 participantes participará deste estudo. Serão 100 pacientes diagnosticados com hanseníase e 20 indivíduos saudáveis. Todos os pacientes serão recrutados no Ambulatório Souza Araújo. Os participantes saudáveis serão recrutados no Pavilhão da Biologia.

##### O QUE ACONTECERÁ SE EU PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Como parte da sua rotina de atendimento no Ambulatório Souza Araújo e antes de iniciar o seu tratamento para hanseníase, você realizará uma coleta de sangue (7mL) e uma biópsia da pele (retirada de um pedaço pequeno da pele onde tem uma mancha ou caroço).

“PAPEL DE NEUTRÓFILOS NA IMUNOPATOGÊNESE DA HANSENÍASE”

Rubrica do Participante \_\_\_\_\_

Rubrica do Membro da Equipe \_\_\_\_\_

1/6

## 8.2 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DE DOADORES SADIOS (TCLE)



Ministério da Saúde  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) Participantes Sadios

#### TÍTULO DA PESQUISA: “PAPEL DE NEUTRÓFILOS NA IMUNOPATOGÊNESE DA HANSENÍASE”

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Verônica Schmitz Pereira

TELEFONE: (21) 2562-1579

#### INTRODUÇÃO

Você está sendo convidado a participar de um estudo porque é um adulto saudável, não tem hanseníase. Desta forma, este documento apresentado agora, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), tem como objetivo assegurar seus direitos como participante da pesquisa e é elaborado em duas vias, uma que deverá ficar com você e outra com o pesquisador.

#### POR QUE ESTE ESTUDO ESTÁ SENDO REALIZADO?

Esse estudo está sendo realizado para saber como estão os seus neutrófilos (uma célula que fica no sangue). Os neutrófilos podem ir para qualquer parte do seu corpo e ajudar no combate contra a qualquer doença. Em alguns pacientes com hanseníase os neutrófilos vão para a pele, e pretendemos investigar a associação de neutrófilos que migram para a pele com a doença. Se você concordar serão realizados vários testes nos seus neutrófilos do sangue.

#### QUANTAS PESSOAS PARTICIPARÃO DESTE ESTUDO?

Um total de 120 participantes participará deste estudo. Serão 100 pacientes diagnosticados com hanseníase e 20 indivíduos sadios. Todos os pacientes serão recrutados no Ambulatório Souza Araújo. Os participantes sadios serão recrutados no Pavilhão da Biologia.

#### O QUE ACONTECERÁ SE EU PARTICIPAR DESTE ESTUDO?

Se você concordar em participar, os pesquisadores irão solicitar a doação de 45 mL de sangue [o equivalente a três colheres de sopa de sangue (15 mL = 1 colher de sopa)].

#### QUANTO TEMPO PERMANECEREI NO ESTUDO?

Para os participantes sadios apenas uma visita será necessária. A duração do estudo é de 1 dia.

“PAPEL DE NEUTRÓFILOS NA IMUNOPATOGÊNESE DA HANSENÍASE”

Rubrica do Participante \_\_\_\_\_

Rubrica do Membro da Equipe \_\_\_\_\_



## 8.3 COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

COMISSÃO NACIONAL DE  
ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** Papel de neutrófilos na imunopatogênese da hanseníase

**Pesquisador:** Verônica Schmitz Pereira

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

**Versão:** 6

**CAAE:** 56113716.5.0000.5248

**Instituição Proponente:** Instituto Oswaldo Cruz-RJ

**Patrocinador Principal:** Fundação Oswaldo Cruz  
Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior  
CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.126.683

#### Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo Informações Básicas da Pesquisa (PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_1176930\_E1.pdf de 05/12/2018).

#### INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença de evolução crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* e é a principal doença infecciosa responsável por incapacidades no mundo. Em virtude do tropismo do bacilo por macrófagos de pele e células de Schwann nos nervos periféricos, as principais manifestações clínicas da Hanseníase incluem lesões de pele, mucosas e nervos, sendo a infecção do tecido nervoso responsável pela perda da sensibilidade local típica da doença (revisado por Britton & Lockwood, 2004). A alta eficiência da terapia antimicobacteriana levou à redução da prevalência da doença, entretanto não houve diminuição na detecção de novos casos. O Brasil é o segundo país mais afetado no mundo e é responsável pela maioria dos casos nas Américas. A taxa global de novos casos em 2014 foi 215.656; e somente no Brasil foi de 31.064 (WHO, 2014). Os desafios atuais para as áreas endêmicas ou "hotspots" da hanseníase são muitos como: (1) detecção

**Endereço:** SRNTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.719-049

**UF:** DF

**Município:** BRASÍLIA

**Telefone:** (61)3315-5877

**E-mail:** conep@saude.gov.br

