

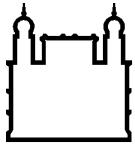
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Medicina Tropical

Identificação de Biomarcadores de Angiogênese no Eritema Nodoso
Hansênico e na Hanseníase

Ana Carolina Duarte Pereira Rodrigues

Rio de Janeiro
2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Ana Carolina Duarte Pereira Rodrigues

Identificação de Biomarcadores de Angiogênese no Eritema Nodoso Hansênico e na
Hanseníase

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

Orientador: Prof. Dr^a Veronica Schmitz Pereira

RIO DE JANEIRO

Fevereiro de 2020

Rodrigues, Ana Carolina Duarte Pereira.

Identificação de biomarcadores de angiogênese no Eritema Nodoso Hansênico e na Hanseníase / Ana Carolina Duarte Pereira Rodrigues. - Rio de Janeiro, 2020.

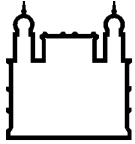
67 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2020.

Orientadora: Veronica Schmitz Pereira.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Angiogênese. 2. Biomarcadores. 3. Eritema Nodoso Hansênico. 4. Hanseníase. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

AUTOR: ANA CAROLINA DUARTE PEREIRA RODRIGUES

**Identificação de Biomarcadores de Angiogênese no Eritema Nodoso
Hansênico e na Hanseníase**

ORIENTADOR: Prof. Dr^a. Veronica Schmitz Pereira

Aprovada em: 17 / 02 / 2020

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Geraldo Moura Batista Pereira - **Presidente (IOC/Fiocruz)**

Prof. Dr^a. Marcia de Berredo Pinho (IOC/Fiocruz)

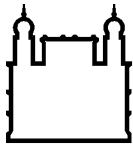
Prof. Dr^a. Luciana Silva Rodrigues (UERJ)

SUPLENTE:

Prof. Dr. Sergio Augusto Lopes de Souza (UFRJ)

Prof. Dr. Alice Machado Miranda (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 17 de Fevereiro de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Medicina Tropical de **Ana Carolina Duarte Pereira Rodrigues**, sob orientação da Dr^a. Verônica Schmitz Pereira. Ao décimo sétimo dia do mês de fevereiro de dois mil e vinte, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane - Pavilhão Leonidas Deane, o exame da dissertação de mestrado intitulada: "**Identificação de Biomarcadores de Angiogênese no Eritoma Nodoso Hanseniano e na Hanseníase**", no programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Diagnóstico, Epidemiologia e Controle, na linha de pesquisa: Relação Parasito - Hospedeiro. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Geraldo Moura Batista Pereira - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Luciana Silva Rodrigues - UERJ/RJ, Dr^a. Marcia de Berraco Pinho Moreira - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr. Sergio Augusto Lopes de Souza - UFRJ/RJ e Dr^a. Alina de Miranda Machado - 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 Medicina Tropical 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 concluído o exame, a Coordenadora do Programa, Dr^a. Marinha Cecília Suárez Mutis, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 17 de fevereiro de 2020.

Dr. Geraldo Moura Batista Pereira (Presidente da Banca):

Dr^a. Luciana Silva Rodrigues (Membro da Banca):

Dr^a. Marcia de Berraco Pinho Moreira (Membro da Banca):

Dr^a. Marinha Cecília Suárez Mutis (Coordenadora do Programa):

Este trabalho é dedicado a Deus e a
minha família por todo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente, a Deus pelo Dom da vida e por nunca ter deixado eu desistir quando a caminhada parecia ser muito longa e difícil. E por ter colocado pessoas incríveis na minha vida.

A minha mãe Adriana, por ter me dado todo o suporte e apoio para que pudesse chegar até aqui e ser essa pessoa que me tornei. Você é o meu maior exemplo de determinação e força. Eu te amo incondicionalmente!

Ao meu padrasto Wagner, por estar ao lado da minha mãe contribuindo para a minha formação como pessoa e por ter me dando todo o suporte também. Você não sabe o quanto eu gosto de você!

A minha família materna, avó Eloisa, avô Elias, meus tios Rafael, Elias Jr e Eduardo e minhas tias Flávia, Cléo e Érica, que ajudaram na minha criação, que sempre me apoiaram e estão presentes em todos momentos da minha vida. Não seria ninguém sem vocês.

Agradeço a minha orientadora Dr^a Veronica Schmitz, por me receber de braços abertos e ter me dado a oportunidade de viver novas experiências nesses 2 anos de muito aprendizado. Só tenho que agradecer por você ter deixado eu fazer parte da sua equipe e por toda a confiança que me foi passado para conduzir um trabalho novo e cheio de desafios, pode ter certeza de que isso influenciou positivamente no meu crescimento profissional.

Agradeço a todos os colaboradores que contribuirão para o desenvolvimento e aprimoramento desse trabalho de forma direta ou indiretamente: Dr Milton Ozório, Dr^a Cristina Pessolani, Dr^a Thais Porto Amadeu, Dr^a Alice Miranda, Dr^a Mariana Hacker, Dr José Augusto Nery, Dr^a Euzenir Sarno, Msc Thyago Calvo, Dr^a Mayara Mendes, Msc Thabatta Leal, Msc Isabella Forasteiro, Msc Jéssica Brandão, Msc Helen Ferreira.

Agradeço as minhas amigas do laboratório de hanseníase Mariana Martins, Tamiris Bittencourt, Jessica Paixão e Mayara Mendes, por todos os ensinamentos e suporte dentro do laboratório. Com toda certeza de que levarei a amizade de vocês para o resto da vida. Para sempre serão minhas cientistas. Da Fiocruz para a vida!

Agradeço os amigos, Carolina Oliveira, Ana Caroline Macaíba, Aline Silva, Leandro Moragas, Prisciliana Oliveira, Tairine Barreto, Marcelo Vasconcelos, Pamela Mosqueira, Rafaela Miranda, Vinícius Mello, discentes do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical que fiz nesses 2 anos;

A equipe e aos funcionários do laboratório de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz;

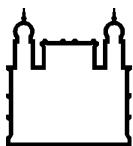
A rede de plataformas de Citometria da Fiocruz e a Dr^a Mariana Gandini;

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

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - sob o código de financiamento 001 e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro que possibilitaram o andamento e finalização dessa dissertação;

Por fim, agradeço a todos que de algum modo, fizeram parte deste momento da minha vida.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus não sou o que era antes.”
(Martin Luther King)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

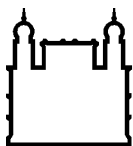
IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE ANGIOGÊNESE NO ERITEMA NODOSO HANSÊNICO E NA HANSENÍASE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Ana Carolina Duarte Pereira Rodrigues

A hanseníase é uma doença infecciosa de evolução crônica, porém o curso natural da doença pode ser interrompido por episódios reacionais agudos que são caracterizados por uma ativação da resposta inflamatória acelerando o agravamento no dano tecidual e neural. O Eritema Nodoso Hansênico (ENH), um desses episódios reacionais, é uma complicação imunológica grave que acomete os pacientes multibacilares (BL e LL). A presença de neutrófilos na lesão de pele dos pacientes com ENH é considerada uma marca histológica dessa reação, porém ainda não é claro como ocorre o recrutamento desses neutrófilos para o sítio inflamatório e como este tipo celular participa dos mecanismos patológicos. Já foi visto na literatura que a angiogênese está presente de forma aumentada em lesões de pele de pacientes lepromatosos (LL) com e sem ENH sendo associada ao aumento da carga bacilar e progressão da doença. Embora o mecanismo de formação de novos vasos tenha sido bastante estudado na hipóxia tecidual e em outros processos inflamatórios, na hanseníase ainda não está bem descrito. Levando em consideração que a angiogênese está presente nos achados histopatológicos da hanseníase LL e no ENH, esse estudo propõe avaliar os níveis proteicos e a expressão gênica de VEGF-A, VEGFR1, PDGF, HIF1A e ITGB3 em amostras de sangue e pele de pacientes LL com e sem ENH e controles (pacientes BT e doadores sadios). 13 pacientes BT e 28 LL antes de iniciar o tratamento com a poliquimioterapia e 23 pacientes ENH antes do início do tratamento anti-reacional, 13 pacientes ENH 7 dias após o início do tratamento com talidomida e 3 doadores sadios foram recrutados no Ambulatório Souza Araújo, Rio de Janeiro. Os níveis séricos de VEGF-A e PDGF-BB foram determinados por ELISA. A expressão proteica de VEGFR1 na superfície de neutrófilos circulantes foi determinada por citometria de fluxo multiparamétrica. A expressão de RNAm de *VEGF-A*, *PDGF-A*, *HIF1A* e *ITGB3* na pele foram determinadas por RT-qPCR. Os níveis circulantes de VEGF-A em pacientes LL foram significativamente aumentados quando comparados com pacientes BT. Pacientes LL com e sem ENH apresentaram níveis séricos de VEGF-A comparáveis, porém 7 dias após o início do tratamento com talidomida houve redução. Neutrófilos circulantes de pacientes BT apresentaram maior expressão de VEGFR1 quando comparados com pacientes LL. Os neutrófilos de pacientes LL apresentaram níveis de VEGFR1 similares aos neutrófilos de doadores sadios. A expressão de VEGFR1 em neutrófilos assim com a frequência de neutrófilos VEGFR1⁺ foi menor em pacientes ENH quando comparados a todos os grupos de pacientes e doadores saudáveis. Os níveis de RNAm de *VEGF-A* foi significativamente maior na pele de pacientes ENH quando comparados aos pacientes BT e LL não reacionais. A expressão gênica de *HIF1A* foi maior nas lesões de pele de pacientes ENH quando comparados com LL e BT. Os níveis de *PDGFA* e *ITGB3* nas lesões LL com e sem ENH foram comparáveis. Os nossos resultados sugerem que neutrófilos de pacientes ENH migrem para as lesões de pele através da via VEGF-A/VEGFR1 e que a angiogênese detectada nas lesões de pele de pacientes ENH induzem a expressão de HIF.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

IDENTIFICATION OF ANGIOGENESIS BIOMARKERS IN ERYTHEMA NODOSUM LEPROSUM AND LEPROSY

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Ana Carolina Duarte Pereira Rodrigues

Leprosy is an infectious disease of chronic evolution, however the natural course of the disease can be interrupted by acute reaction episodes that are characterized by an activation of the inflammatory response accelerating the worsening of tissue and neural damage. Hansen's Nodous Erythema (ENL), one of these reaction episodes, is a serious immunological complication that affects multibacillary patients (BL and LL). The presence of neutrophils in the skin lesion of patients with ENL is considered a histological mark of this reaction, however it is still unclear how these neutrophils are recruited to the inflammatory site and how this cell type participates in the pathological mechanisms. It has already been seen in the literature that angiogenesis is present in an increased form in skin lesions of lepromatous patients (LL) with and without ENL being associated with increased bacillary load and disease progression. Although the mechanism of formation of new vessels has been extensively studied in tissue hypoxia and other inflammatory processes, leprosy is not well described. Taking into account that angiogenesis is present in the histopathological findings of leprosy LL and in ENL, this study proposes to evaluate the protein levels and the gene expression of VEGF-A, VEGFR1, PDGF, HIF1A and ITGB3 in blood and skin samples from LL patients with and without ENL and controls (BT patients and healthy donors). 13 BT and 28 LL patients before starting treatment with polychemotherapy and 23 ENL patients before starting anti-reactive treatment, 13 ENL patients 7 days after starting thalidomide treatment and 3 healthy donors were recruited from the Souza Araújo Ambulatory, Rio de Janeiro. Serum levels of VEGF-A and PDGF-BB were determined by ELISA. Protein expression of VEGFR1 on the surface of circulating neutrophils was determined by multiparametric flow cytometry. VEGF-A, PDGF-A, HIF1A and ITGB3 mRNA expression in the skin were determined by RT-qPCR. Circulating VEGF-A levels in LL patients were significantly increased when compared to BT patients. LL patients with and without ENL had comparable serum VEGF-A levels, but 7 days after starting thalidomide treatment there was a reduction. Circulating neutrophils from BT patients showed higher expression of VEGFR1 when compared to LL patients. Neutrophils from LL patients had levels of VEGFR1 similar to neutrophils from healthy donors. The expression of VEGFR1 in neutrophils as well as the frequency of VEGFR1 + neutrophils was lower in ENL patients when compared to all groups of patients and healthy donors. VEGF-A mRNA levels were significantly higher in the skin of ENL patients when compared to non-reactive BT and LL patients. The gene expression of HIF1A was higher in skin lesions of ENL patients when compared to LL and BT. The levels of PDGFA and ITGB3 in LL lesions with and without ENL were comparable. Our results suggest that neutrophils from ENL patients migrate to skin lesions via the VEGF-A / VEGFR1 pathway and that angiogenesis detected in skin lesions in ENL patients induces HIF expression.

SUMÁRIO

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XI
LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE SIGLAS	XIII
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 A hanseníase	1
1.1.1. Características gerais.....	1
1.1.2. Epidemiologia.....	2
1.1.3. Agente Etiológico.....	4
1.1.4. Classificações e formas clínicas.....	5
1.1.5. Imunopatogênese da hanseníase.....	9
1.1.6. Diagnóstico.....	12
1.1.7. Tratamento.....	14
1.1.8. Episódios Reacionais.....	15
1.2. Eritema Nodoso Hansênico.....	16
1.2.1 Tratamento para o Eritema Nodoso Hansênico.....	19
1.3. Angiogênese.....	21
1.3.1 Angiogênese induzida por processos inflamatórios.....	21
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Específicos.....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1 Ética.....	28
4.2 Pacientes.....	28
4.3 Escala de gravidade do ENH	29
4.4 Amostras clínicas.....	30
4.5 Processamento do sangue para obtenção do soro	31
4.6 Ensaio imunoenzimático (ELISA).....	31
4.7 Processamento do sangue para obtenção dos neutrófilos.....	31
4.8 Avaliação do grau de pureza das preparações de neutrófilos	32
4.9 Citometria de Fluxo	32
4.10 Extração e tratamento de RNA	33
4.11 Avaliação da integridade do RNA e transcrição reversa	34
4.12 Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	35
4.13 Análise Estatística.....	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Análise de níveis séricos de fatores de crescimento angiogênicos nos pacientes com hanseníase (com ou sem ENH)	37
5.2 Análise da expressão de VEGFR1 em neutrófilos circulantes de pacientes com hanseníase (com ou sem ENH)	41
5.3 Análise da expressão de genes da via de angiogênese na lesão de pele de pacientes com hanseníase (com ou sem ENH).....	43
6 DISCUSSÃO	46

7	CONCLUSÕES	53
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9	ANEXO A	66
10	ANEXO B	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase, 2018.....	3
Figura 1.2: Gráfico de registro de novos casos em regiões do Brasil em 2018.....	4
Figura 1.3: Representação esquemática da classificação operacional proposta pela OMS, em 1988.....	9
Figura 1.4: Dicotomia da resposta imune por células Th1 x Th2 nas formas polares da hanseníase.....	12
Figura 1.5: Aspecto clínico e histopatológico do ENH.....	17
Figura 1.6: Etapas do mecanismo de formação de novos vasos (angiogênese).....	24
Figura 5.1: Níveis séricos de VEGF como potencial biomarcador de hanseníase multibacilar.....	37
Figura 5.2: Redução dos níveis de VEGF em pacientes com ENH após 7 dias do início do tratamento com talidomida.....	38
Figura 5.3: Acompanhamento longitudinal dos pacientes MB que progrediram para a reação ENH e foram tratados com talidomida por 7 dias.....	39
Figura 5.4: Níveis de PDGF-BB no soro de pacientes com hanseníase.....	39
Figura 5.5: Dosagem de PDGF-BB no soro de pacientes com hanseníase e reacionais.....	40
Figura 5.6: Acompanhamento longitudinal dos pacientes MB que progrediram para a reação ENH e foram tratados com talidomida por 7 dias.....	41
Figura 5.7: Grau de pureza e estratégia de análise da expressão de VEGFR1 em neutrófilos purificados do sangue periférico.....	42
Figura 5.8: Neutrófilos de pacientes com hanseníase apresentam perfil pró-angiogênico.....	43
Figura 5.9: Expressão de genes da via de angiogênese em pacientes com hanseníase (com ou sem reação ENH).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Prevalência registrada e detecção de novos casos em 2018, por regiões da OMS.....	2
Tabela 4.1: Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo.....	29
Tabela 4.2: Características demográficas e clínicas dos pacientes ENH incluídos no estudo.....	30
Tabela 4.3: Primers incluídos no estudo.....	36

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- % - Porcentagem
°C – Graus Celsius
µL - Microlitros
ANG-2 - Angiopoetina-2
ASA - Ambulatório Souza Araújo
BAAR – Bacilo álcool-ácido resistente
BB - *Borderline-borderline*
BL - *Borderline-lepromatosa*
BSA - albumina sérica bovina
BT - *Borderline-tuberculoide*
CD – *Cluster* de diferenciação
DS - Doadores sadios
EGF - Fator de crescimento epidérmico
ELISA - Ensaio imunoenzimático
ENH - Eritema Nodoso Hansênico
ENLIST – Estudo Internacional Eritema Nodoso Hansênico (*Erythema Nodosum Leprosum International Study*)
FGF – Fator de crescimento de fibroblastos
Fiocruz – Fundação Oswaldo Cruz
FMO - Controle de fluorescência mínima (*Fluorescence Minus One control*)
FSC - Dispersão frontal da luz (*Forward Scatter*)
FSC-A - Dispersão frontal da luz que mede a área (*Forward Scatter-Area*)
FSC-H - Dispersão frontal da luz que mede a altura (*Forward Scatter-Height*)
HCl – Ácido Clorídrico
HIF-1α - Fator induzível por hipóxia 1 alfa
IB - Índice baciloscópico
IFN-γ - Interferon gama
IgM - Imunoglobulina M
IL - Interleucinas
ILB – Índice baciloscópico da lesão
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
ITGB3 – Integrina beta 3
kg – Quilograma
LAM - Lipoarabinomanana
LL – Lepromatoso-epromatoso
LPS – Lipopolissacarídeo
M. leprae - *Mycobacterium leprae*
MB - Multibacilares
MEC - Componentes da matriz extracelular
MFI - Mediana de intensidade de fluorescência
mg – Miligrama
mL - Mililitro
mm - Milímetro
MMPs – Metaloproteinase de matriz
N/A - Não se Aplica
NETs - Armadilhas extracelulares de neutrófilos (*neutrophil extracellular traps*)
NF-κB - Fator nuclear kappa B
Nm - Nanômetros
NRPs - Neuropilinas
O₂ - Oxigênio
OMS - Organização Mundial de Saúde
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos
PB - Paucibacilares
PBS - tampão fosfato salina
PDGF-B - Fator de crescimento derivado de plaquetas B
pg/mL – Picogramas por mililitros
PGL-1 - Glicolípido fenólico
PQT - Poliquimioterápico
PTX3 - Pentraxina-3
RNA - Ácido ribonucleico
RPL13A - proteína ribossômica L13A
RR - Reação reversa
RT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SSC - Dispersão lateral da luz (*Side Scatter*)
TGF-β - Fator de crescimento transformador beta
TIMPs - inibidores teciduais de metaloproteinases
TLRs - Receptores do tipo *Toll*
TMB - 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina
TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa
TT – Tuberculoide-tuberculoide
VEGF-A - Fator de crescimento endotelial vascular A
VEGFR1 – Fator de crescimento vascular endotelial receptor 1
xg – força G

1. INTRODUÇÃO:

1.1. A hanseníase

1.1.1. Características gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo bacilo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), que afeta principalmente o nervo periférico e a pele (Lastória; Abreu, 2014). Esta enfermidade ainda representa um problema de saúde pública pelo seu poder de causar incapacidade física, social e econômica, visto que o comprometimento dos nervos periféricos pode provocar problemas motores e sensoriais graves, que muitas vezes podem ser irreversíveis se não for tratada (Scollard et al., 2015; Noriega et al., 2016).

A hanseníase é uma doença com alta infectividade (capacidade do bacilo de infectar grande número de indivíduos) e baixa patogenicidade (capacidade de adoecimento dos indivíduos infectados) (Ministério da Saúde, 2019). Já foi descrito que indivíduos que possuem contato direto e contínuo com pacientes multibacilares não tratados apresentam maior risco de contrair a doença (Moet et al., 2006; Moraes et al., 2006; Sales et al., 2011). É provável que a rota de transmissão seja pelas vias aéreas superiores, pois já foi detectado o DNA do *M. leprae* em amostra de biópsia da mucosa nasal de indivíduos saudáveis em áreas endêmicas (Klatser et al., 1993; Patrocínio et al., 2005).

Comparado a outros patógenos, o *M. leprae* apresenta baixa variabilidade genética (Monot et al., 2005). Devido a essa característica foi possível traçar a disseminação da doença de acordo com as rotas migratórias humanas pelo mundo. As evidências atuais apontam que o *M. leprae* se originou na Eurásia, provavelmente no extremo Oriente (Benjak et al., 2018). Além do homem, outros hospedeiros naturais foram identificados mais recentemente como reservatórios naturais do *M. leprae* como os tatus nos Estados Unidos (Truman et al., 2011), esquilos vermelhos nas Ilhas Britânicas (Avanzi et al., 2016) e primatas não humanos na África (Honap et al., 2018).

1.1.2. Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), pelos relatórios oficiais de 159 Estados-Membros e territórios recebidos em 2019, a prevalência mundial registrada de hanseníase em 2018 foi de 184.212 casos, o que representa uma taxa de 0,24 casos por 10.000 habitantes. O número de novos casos notificados globalmente neste ano reportado foi de 208.619 (2,74 novos casos por 100.000 habitantes) (OMS, 2019). Na tabela 1.1 mostra detalhadamente o registro de prevalência e a detecção dos novos casos reportados em 2018.

Tabela 1.1: Prevalência registrada e detecção de novos casos em 2018, por regiões da OMS.

Regiões da OMS	Número de registro de casos	Prevalência/10.000 habitantes	Número de novos casos detectados	Taxa de detecção de novos casos/100.000 habitantes
África	22861	0.21	20586	1.93
Américas	34358	0.34	30957	3.08
Mediterrâneo oriental	5074	0.07	4338	0.62
Europa	39	<0.0	50	0.01
Sudeste Asiático	114004	0.58	148495	7.49
Pacífico Ocidental	7876	0.04	4193	0.22
Mundo	184212	0.24	208619	2.74

Fonte: Adaptado de OMS, 2019.

Em comparação com 2017, foi registrado em 2018 uma ligeira queda de 1,2% no número de casos novos detectados no mundo. Entretanto, foi relatado um aumento significativo de novos casos nas regiões das Américas, Mediterrâneo Oriental e na região Européia neste ano, como mostra a distribuição geográfica do número de novos casos de hanseníase em 2018 na figura 1.1 (OMS, 2019). As análises mostraram que Brasil, Índia e Indonésia são os países mais endêmicos do mundo, sendo responsáveis por 79,6% dos casos novos. Onde a região do Sudeste Asiático respondeu por 71% do número de novos casos no mundo, com a Índia e a Indonésia apresentando 92% do número de novos casos nessa região. O Brasil contribuiu com 93% da carga na região das Américas em 2018 (OMS, 2019).

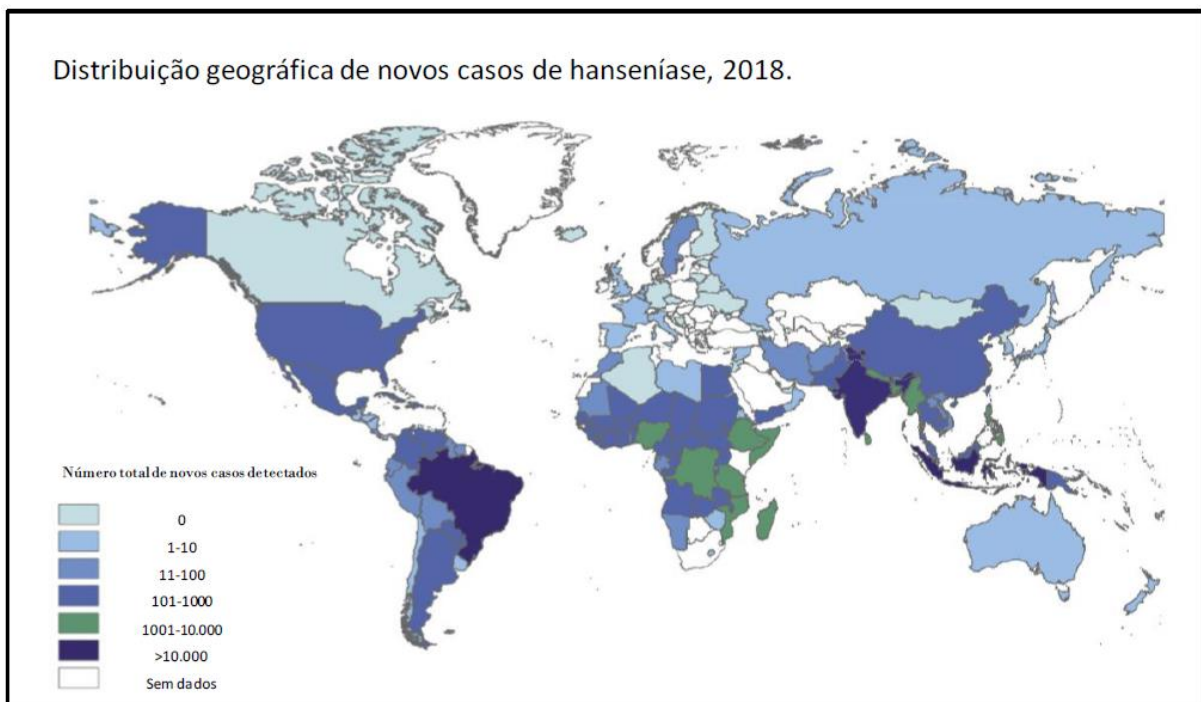


Figura 1.1: Distribuição geográfica dos novos casos de hanseníase, 2018. Fonte: OMS, 2019.

Nos parâmetros mundiais, o Brasil se encontra em 2º lugar com maior número de novos casos de hanseníase, com o registro de 28.660 novos casos detectados em 2018, ficando atrás somente da Índia (120.334 casos novos detectados) e na frente da Indonésia (17.017 novos casos detectados) (OMS, 2019). De acordo com o boletim do Ministério da Saúde referente ao período de 2003 a 2018, foram diagnosticados 586.112 casos novos de hanseníase no Brasil e 43.479 casos novos em menores de 15 anos. O registro de casos novos de hanseníase por regiões do Brasil em 2018, representada na Figura 1.2, mostra que região Nordeste apresenta o maior número de novos casos, registrando 11.725 novos casos, e a região com menor registro de casos novos foi a região Sul, com 797 novos casos registrados (www.saude.gov.br).

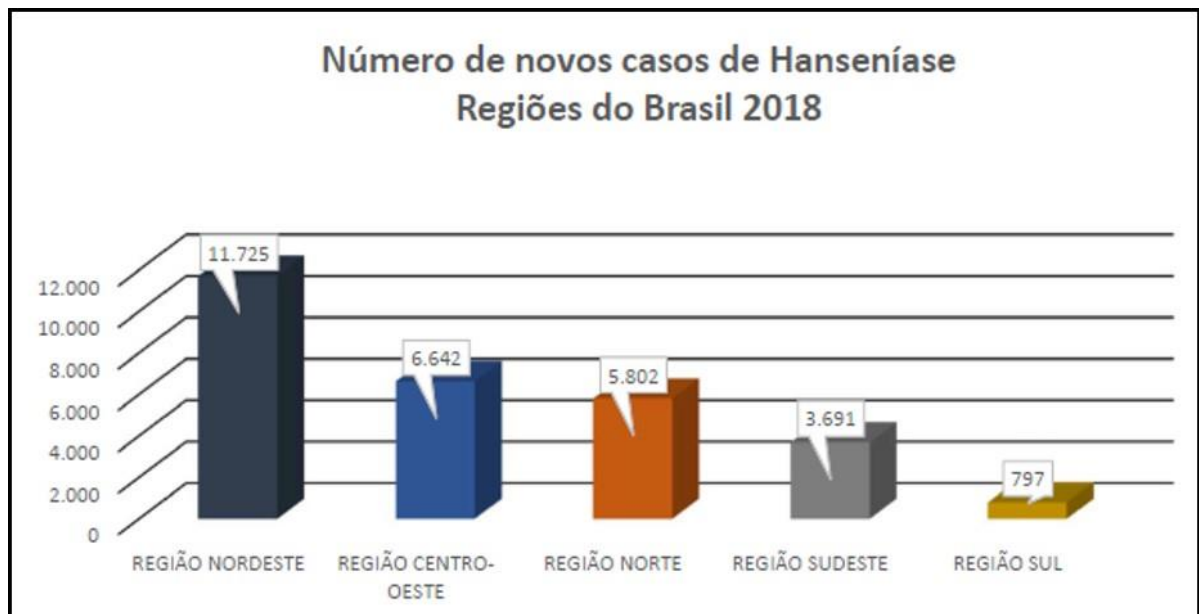


Figura 1.2: Gráfico de registro de novos casos de hanseníase em regiões do Brasil em 2018. Fonte: Adaptado de Ministério da Saúde, 2019 (www.saude.gov.br).

1.1.3. Agente Etiológico:

Identificado em 1873, por Gerhard Henrik Armauer Hansen em amostra de biópsia de pele, o *M. leprae* pertence à classe *Schizomycetes*, ordem *Actinomycetales*, família *Mycobacteriaceae* e ao gênero *Mycobacterium*. O *M. leprae*, uma bactéria gram positiva, em forma de bastonete, levemente curvado, é álcool-ácido resistente (BAAR) por se corar de vermelho pela fucsina e não se descorar pela lavagem de álcool-ácido no método de coloração de Ziehl-Neelsen (Rees et al., 1994 Apud Lastória et al., 2014). O *M. leprae* é uma bactéria intracelular obrigatória, que infecta predominantemente macrófagos e células de Schwann humanas, se replicando lentamente por fissão binária a cada 12-14 dias, o que faz o período de incubação da doença ser, em média, de 5 anos (Shepard, 1960; Hastings et al., 1988).

Esta bactéria apresenta estruturas comuns ao gênero que ela pertence, como a abundância de lipídios na forma de ácidos micólicos (ácidos graxos de elevado peso molecular) e lipoarabinomanana (LAM) em sua parede celular (Hunter; Brennan, 1981). A membrana plasmática tem uma bicamada lipídica permeável contendo proteínas de interação. A parede celular que é unida à membrana plasmática é composta por peptidoglicanos ligados a polissacarídeos de cadeia

ramificada, constituídos por arabinogalactanos, que suportam os ácidos micólicos e LAM (Hirata, 1985). A estrutura mais externa, cápsula, é composta por lipídios, especialmente fitiocerol dimicocerosato e glicolípido fenólico (PGL-1), que tem um trissacarídeo ligado a lipídios por uma molécula de fenol. Este lipídio dominante na parede celular é que dá a especificidade imunológica ao *M. leprae* (Ng et al., 2000; Scollard et al., 2006).

Apesar dos inúmeros trabalhos envolvendo o *M. leprae*, esta bactéria não é cultivável em meios de cultura artificiais, o que dificulta o estabelecimento de estudos que elucidariam vários aspectos da patogenia causada por este microrganismo (Reibel et al., 2015). Entretanto, Shepard (em 1960), cultivou o bacilo pela inoculação da bactéria no coxim plantar de camundongos CFW e observou um modesto crescimento localizado e limitado do bacilo. Este modelo foi fundamental para os avanços dos estudos *in vivo* e *in vitro* da hanseníase. (Shepard, 1960). Já em 1971, Kirchheimer e Storrs inocularam o bacilo em tatus de nove bandas (*Dasypus novemcinctus*) e verificaram uma multiplicação maciça de *M. leprae*, o que possibilitou ser um bom modelo animal para estudos *in vivo* (Kirchheimer, Storrs, 1971). Outros estudos demonstraram também que esta espécie de tatu infectado naturalmente, manifesta a doença sistemicamente (Binford et al., 1977; Truman et al., 2011).

A fim de encontrar respostas sobre os aspectos patológicos do *M. leprae*, realizando análises genéticas em lesões de pele de pacientes multibacilares, foi possível isolar e analisar o genoma completo do bacilo. Esta análise mostrou que houve uma redução evolutiva no genoma do *M. leprae* em comparação ao *Mycobacterium tuberculosis*, onde somente cerca de 49% do seu genoma é codificante. Isto afeta diversas e essenciais vias metabólicas que agem principalmente na sua replicação, o que pode explicar a dependência do metabolismo celular e a dificuldade do cultivo *in vitro* (Cole et al., 2001).

1.1.4. Classificações e formas clínicas:

Estima-se que 95% dos indivíduos expostos ao *M. leprae* são naturalmente resistentes à infecção e nos 5% susceptíveis, a doença pode se manifestar de diferentes formas clínicas, o que está muito ligada à condição imunológica do

paciente (CDC, 2017). Por apresentar um amplo e complexo espectro de manifestações clínicas e imunológicas ao longo dos anos foram determinadas várias formas de classificação dos pacientes para facilitar o diagnóstico e o tratamento da doença. Atualmente existem três principais sistemas de classificação da hanseníase adotados pelos profissionais de saúde: sistema de Madri, a classificação de Ridley & Jopling e o sistema operacional da OMS.

Rabello, em 1941, um dos primeiros a estabelecer o conceito de formas polares, propôs que indivíduos que apresentavam hanseníase indeterminada (I), quando não tratados, evoluiriam para a forma polar tuberculoide (TT) ou para o polo lepromatoso (LL), dependendo da resposta imune ao *M. leprae*. Utilizando o conceito de formas polares de Rabello, em 1953, durante a IV Congresso de Hanseníase realizado em Madri, foi adicionado um grupo clinicamente instável ao longo do seu curso e caracterizado por manifestações que não se encaixam nas formas polares que foi definido como hanseníase dimorfa (ou *borderline*) (Ministério da Saúde, 1960; Lastória; De Abreu, 2014; Cruz et al., 2017). Seguindo os critérios clínicos, bacteriológico, histológico e de imunorreatividade à lepromina, esta classificação dividiu a hanseníase em: forma indeterminada, tuberculoide, dimorfa e virchoviana (Lockwood; Sarno; Smith, 2007).

Ridley e Jopling, em 1966, considerando características histopatológicas e clínicas, carga bacteriana e variações na resposta imunológica dos pacientes, classificou os pacientes com hanseníase em um amplo espectro composto por cinco formas clínicas: os polos tuberculoide-tuberculoide (TT) e lepromatoso-lepromatoso (LL), além das formas intermediárias denominadas *borderline*-tuberculoide (BT), *borderline-borderline* (BB) e *borderline*-lepromatosa (BL) (Ridley; Jopling, 1966). Os indivíduos que apresentam uma resposta imunológica e manifestações clínicas não definidas, caracterizados por apresentar lesões hipocrômicas e sem manifestação de granulomas em sua histopatologia, além da ausência de bacilos na lesão são denominados de indeterminados. Inicialmente essa forma clínica foi considerada como uma manifestação inicial da doença, que poderiam ao longo do tempo evoluir para qualquer uma das formas mencionadas anteriormente ou até atingir a cura espontânea (Ridley; Jopling, 1966; Fleury, 2006).

Os pacientes do polo TT apresentam única lesão de pele que, na maioria das vezes, é hipopigmentada ou eritematosa, delimitada por micropápulas, e,

quando placa, como lesão eritematosa ou acobreada, com bordas elevadas, ásperas, sem pelos e demonstram centro com sinais de regressão ou cura. A superfície da lesão é seca por causa da deficiência de sudorese. A perda de sensibilidade e margens bem definidos das lesões são sinais característicos desta forma clínica. Ocorre espessamento do nervo periférico que geralmente fica localizado próximo à lesão, sendo geralmente palpável. O comprometimento neural pode causar anestesia, analgesia, hiperalgesia e fraqueza muscular (Ridley; Jopling, 1966; Souza, 1997; Fleury, 2006).

Na análise histológica pode ser observado infiltração de células epitelioides bem diferenciadas, células gigantes do tipo Langhans, circundados por linfócitos na periferia, constituindo um granuloma bem definido, que invade a derme e a epiderme. Pode haver comprometimento de filetes nervosos e anexos cutâneos. Esta forma clínica é considerada um polo de resistência ao bacilo devido à boa resposta imune mediada por células, o que os fazem apresentar raros bacilos na lesão, com baciloscopia negativa e frequentemente com ulceração central (Souza, 1997; Scollard et al., 2006).

Os pacientes classificados como BT apresentam lesões cutâneas e perda sensorial muito parecida com as encontradas na forma tuberculoide. O que as diferenciam é o fato de serem menores e mais numerosas com bordas menos evidentes, o crescimento de pelos no local não é afetado e o número de nervos acometidos é maior. A histologia desses pacientes é dificilmente distinguível dos pacientes TT, mas diferenciam-se das lesões de pacientes BB por apresentar maior quantidade de células epitelioides que estão cercadas por linfócitos ou pela presença de células de Langhans. Os nervos presentes no granuloma geralmente estão edemaciados e infiltrados, e a inervação do granuloma está diminuída. Os bacilos são escassos na lesão e a baciloscopia é positiva (Ridley; Jopling, 1966).

Os pacientes da forma clínica BB apresentam aspectos intermediários quanto ao número e ao tamanho das lesões, que são placas eritematosas de formato irregulares e com centro hipopigmentado. Na análise histológica, apresentam células epitelioides dispersas pelo granuloma, com ausência de células de Langhans e podem ter ausência ou presença de linfócitos dispersos. Os feixes de nervos são de fácil detecção e indicam proliferação moderada de células de Schwann. Os bacilos estão presentes na lesão (Ridley; Jopling, 1966).

A forma clínica BL manifestam lesões muito semelhantes às encontradas em pacientes LL, pois podem apresentar máculas, placas, pápulas e nódulos. São numerosas, apresentam tamanhos irregulares e pouca anestesia. São encontrados muitos bacilos nas lesões e o espessamento dos nervos aparece precocemente. A histologia pode mostrar granuloma composto por histiócitos com poucos linfócitos na lesão ou pode aparecer como um granuloma densamente infiltrado por linfócitos e histiócitos repleto de bacilos. Os feixes nervos são geralmente danificados e ocorre grande presença de bacilos na lesão (Ridley; Jopling, 1966).

Já na forma clínica LL, os pacientes apresentam a doença de forma disseminada, pois são mais susceptíveis à infecção, o que os faz apresentar numerosas lesões, com grande quantidade de bacilos, que podem ser máculas ou pápulas eritematosas, podendo apresentar hipopigmentação em alguns casos. As lesões não são anestésicas ou anidróicas. E as lesões podem evoluir para placas e nódulos com o tempo ou podem aparecer todos os tipos de lesão ao mesmo tempo no paciente. Pode ocorrer perda de cílios e sobrancelhas, “face leonina”, ulceração nasal, deformidades no nariz, ceratite, irite, alterações nas mãos e nos pés. Os nervos periféricos geralmente não são palpáveis e sofrem degeneração ou fibrose, levando a anestesia e perda de massa muscular nas mãos e nos pés (Ridley; Jopling, 1966).

A histologia desses pacientes mostra um granuloma composto por histiócitos com alteração de gordura formando globias por conta da presença de células espumosas, o que é uma característica somente da histopatologia dos pacientes LL. Geralmente os linfócitos são escassos, mas podem aparecer de forma dispersa. Os nervos apresentam dano estrutural, porém não apresentam infiltração celular (Ridley; Jopling, 1966).

Com o propósito de operacionalizar o diagnóstico e o controle dos pacientes, principalmente de áreas endêmicas, a OMS, em 1982, propôs uma classificação mais simplificada que se sobrepôs à escala de Ridley-Jopling para compreender dois regimes distintos de poliquimioterapia (PQT) e baseava-se no índice baciloscópico (IB) dos pacientes. Neste sistema de classificação, os pacientes que apresentavam até 5 lesões de pele, baciloscopia negativa e determinados como TT e BT por Ridley-Jopling foram classificados como paucibacilares (PB). E os pacientes que apresentavam mais de 5 lesões de pele, baciloscopia positiva e

determinados como BB, BL e LL foram classificados como multibacilares (MB) (Souza, 1997; Ministério da Saúde, 2010). Posteriormente, a OMS passou a recomendar apenas o critério clínico como base para a classificação, visto que a realização da baciloscopia não seria viável em alguns lugares endêmicos (OMS, 1998). Portanto, os pacientes foram divididos em PB quando apresentam até cinco lesões cutâneas e em MB quando apresentam seis ou mais lesões, como mostra a figura 1.3.

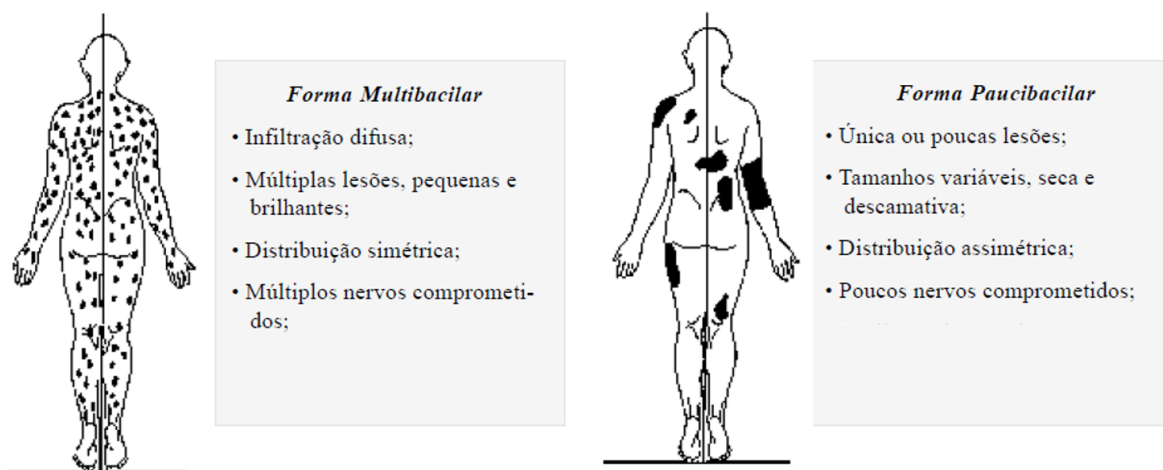


Figura 1.3: Representação esquemática da classificação operacional proposta pela OMS, em 1998. Fonte: Adaptado de Souza, 1997.

1.1.5. Imunopatogênese da hanseníase

A interação inicial entre o patógeno e o hospedeiro é realizada pela ligação de receptores de reconhecimento de padrões (receptores do tipo *Toll* – TLRs) presentes em células fagocíticas, como macrófagos e células dendríticas, aos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) do *M. leprae* no local da infecção. Os principais receptores bem conhecidos na literatura que estão envolvidos no reconhecimento do *M. leprae* por células fagocíticas são o TLR2, TLR4 e TLR9 (Schlesinger; Horwitz, 1991; Santos et al., 2007; Ziakas et al., 2013).

Os macrófagos são células fagocíticas plásticas e heterogêneas que apresentam função central no desenvolvimento da resposta imunológica da hanseníase. Estas células são capazes de induzir mediadores inflamatórios que podem ativar subpopulações de linfócitos específicos, o que são importantes no direcionamento do perfil de resposta imune do hospedeiro (Montoya et al., 2009).

Com base nos conceitos de polarização Th1/Th2, a estimulação de receptores TLR em resposta ao LPS bacteriano (lipopolissacarídeo) e ao interferon gama (IFN- γ) altera o perfil fenotípico dessas células para o fenótipo de macrófagos M1, conhecidos como macrófagos classicamente ativados, que apresentam alta capacidade de expressar citocinas inflamatórias como: fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23), quimiocinas (CCL5, CCL8, CXCL2, entre outras) e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio que conduzem a uma resposta protetora Th1 pela liberação de TNF e IL-12, aumentando a capacidade de apresentação de antígenos e a atividade microbicida (Martinez; Gordon, 2014; Ka et al., 2014).

Já a estimulação de macrófagos pelas citocinas IL-4, IL-10 e/ou IL-13, conhecida como sendo uma via alternativa de ativação, faz com que ocorra a diferenciação dessas células a um perfil anti-inflamatório chamados de macrófagos M2. Os macrófagos M2 produzem citocinas e quimiocinas anti-inflamatórias que antagonizam as ações tóxicas do perfil M1, suprimindo a inflamação, promovendo a regeneração, a angiogênese e conseqüentemente o reparo tecidual (Fairweather; Cihakova, 2009; Sica et al., 2015). Montoya e colaboradores (2009) demonstraram que na lesão de pacientes PB ocorre o predomínio da via antimicrobiana, dependente de vitamina D, em macrófagos de perfil M1, em contrapartida foi observado na lesão de pacientes MB a ação de macrófagos do perfil M2, com a regulação positiva das vias fagocíticas (Montoya et al., 2009; Montoya; Modlin, 2010).

Estudos iniciais da década de 80 demonstraram que lesões de pele de pacientes PB possuem uma maior frequência de linfócitos T CD4⁺ expressando IFN- γ , o que não foi observado na lesão de pacientes MB (Modlin et al., 1983). Também foi observado que as lesões de pacientes PB apresentam intenso infiltrado de linfócitos T CD4⁺ no centro da lesão com poucos linfócitos T CD8⁺ e estes linfócitos CD4⁺ produzem citocinas inflamatórias que auxiliam na formação do granuloma encontrados na histologia desses pacientes. Em contraste, foi observado uma proporção CD4:CD8 invertida nas lesões de pele de pacientes MB, sendo uma maior quantidade de linfócitos T CD8⁺ nas lesões sem formação de granuloma (Modlin et al., 1986).

Mais tarde, pesquisadores mostraram um padrão de resposta imunológica polarizada Th1xTh2 em lesões de pele de pacientes com hanseníase. Arnoldi e colaboradores (1990) analisando por histoquímica a lesão de pele de pacientes de pacientes PB, observaram um aumento de TNF- α e IFN- γ , o que representa um perfil de citocinas do padrão Th1. Já em 1991, a partir de análises da expressão do RNA mensageiro da lesão de pele de pacientes PB e MB, Yamamura e colaboradores demonstraram que lesões de pacientes PB apresentaram um padrão de citocinas predominantemente com perfil de resposta Th1, como IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-32, IFN- γ e TNF- α . Por outro lado, as lesões de pacientes MB apresentaram um padrão de citocinas com perfil de resposta Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (Yamamura et al., 1992).

Posteriormente, a partir da dosagem de níveis séricos de algumas citocinas do perfil Th1 e Th2, foi observado que os níveis séricos de TNF- α e IFN- γ estavam aumentados em PB quando comparados com pacientes MB e uma correlação negativa entre essas citocinas e o índice baciloscópico. Já os pacientes MB apresentaram maiores níveis de IL-10 no soro quando comparados a pacientes PB, o que confirmou a dicotomia de resposta imune entre pacientes PB e MB (Moubasher et al., 1998).

Ao longo dos anos, muitos trabalhos foram desenvolvidos para mostrar a ação das citocinas Th1 e Th2 nos pacientes hansenícos, demonstrando a existência de um padrão de resposta imune distinta que separa esses pacientes em 2 polos (Sousa et al., 2017; Pinheiro et al., 2018). Resumidamente, as citocinas do perfil Th1, como TNF- α , IFN- γ e IL-2, encontradas em pacientes PB ativam macrófagos M1 e linfócitos T CD4⁺, estimulam a formação de um granuloma bem definido e induzem a produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio que destroem o bacilo devido para a liberação de radicais livres. Isto leva a contenção da carga bacilar, o que caracteriza estes pacientes como polo de resistência da doença.

Em contraste, os pacientes MB que apresentam predominantemente maior produção de citocinas Th2, como IL-4, IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), estimulam a produção de linfócitos B para a formação de anticorpos (principalmente anti-PGL-1), inibem a atividade microbicida de macrófagos, regulam negativamente a resposta Th1 e suprimem a produção de IL-12. Este tipo de

resposta leva a disseminação do bacilo, o que está associada ao maior número de lesões (Fonseca et al., 2017; Sadhu; Mitra, 2018) (Figura 1.4).

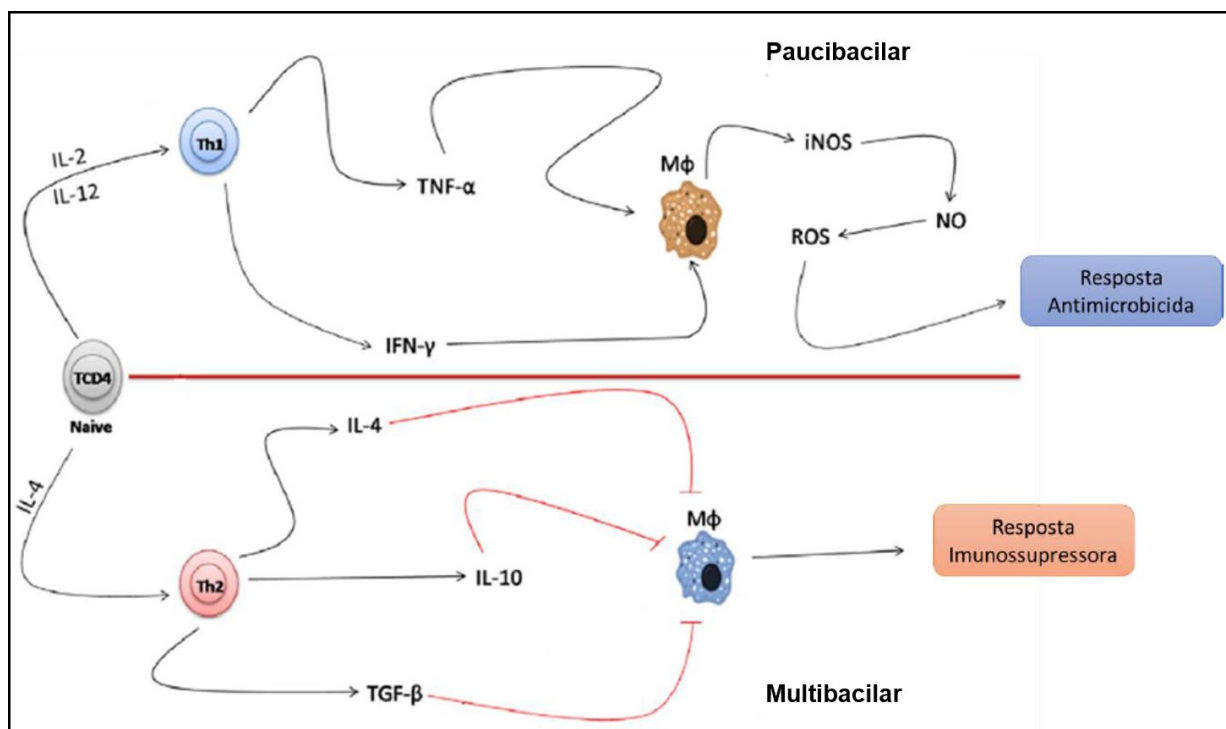


Figura 1.4: Dicotomia da resposta imune por células Th1 x Th2 nas formas polares da hanseníase. Na forma paucibacilar, a produção de TNF- α e IFN- γ por linfócitos Th1, induzem a ativação de macrófagos que produzem óxido nítrico sintase induzida (iNOS), óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS) que leva a destruição do *Mycobacterium leprae* gerando uma resposta antimicrobica. Por outro lado, a forma multibacilar produz uma resposta linfocitária Th2 que favorece a sobrevivência do bacilo, pois resulta da inativação da resposta microbica de macrófagos principalmente devido à produção de citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- β . Fonte: Adaptado de Sousa et al., 2017.

Entretanto, estudos recentes mostraram que, linfócitos T CD4⁺ podem se diferenciar em subpopulações de linfócitos T helper 9 (Th9, Th17, Th22) e T regulador (Treg) dentro das formas polares PB e MB e essas células induzem mecanismos que vão além do padrão de resposta Th1 e Th2 já descrito. Esses trabalhos mostram a existência de novos mecanismos pelos quais as células T podem se desenvolver para contribuir com a imunopatogênese da hanseníase (Saini et al., 2013; Sousa et al., 2016; Sousa et al., 2017).

1.1.6. Diagnóstico

O diagnóstico da hanseníase é essencialmente clínico, realizado por meio dos exames dermatoneurológicos que consistem em analisar a presença de lesões de

pele, alterações de sensibilidade, comprometimento dos nervos periféricos e alterações sensitivas e/ou motoras, e epidemiológico, feito pela análise do perfil sociodemográfico e histórico do paciente (Ministério da Saúde, 2019).

Os critérios clínicos determinados pela OMS e pelo Ministério da Saúde auxiliam no diagnóstico dos pacientes em áreas endêmicas, onde deve ser cogitado se ao menos um dos três sinais cardinais da hanseníase estiverem presentes: perda de sensibilidade em uma lesão hipopigmentada (pálida) ou em mancha avermelhada; nervos periféricos espessados com perda de sensibilidade e/ou fraqueza de musculatura inervada por eles; presença de bacilos álcool-ácido resistentes no raspado intradérmico (Eichelmann et al., 2013).

Adicionalmente ao diagnóstico clínico, é recomendado a realização do exame baciloscópico que consiste na busca ativa pela contagem de bacilos no esfregaço intradérmico, realizado através da linfa de lóbulos auriculares, cotovelos e/ou lesões suspeitas, pela coloração de Ziehl-Neelsen com auxílio da microscopia ótica. A baciloscopia apresenta alta especificidade e baixa sensibilidade. Além da baciloscopia, também pode ser realizado o exame histopatológico indicado para estabelecer a confirmação de casos que apresentam complicação diagnóstica, diante da classificação espectral de Ridley-Jopling, na verificação dos eventos reacionais, no controle dos pacientes e para apoio à pesquisa (Manandhar et al., 2013; Fischer, 2017; Ministério da Saúde, 2019).

Os aspectos clínicos, epidemiológicos, histológicos e baciloscópicos ainda são as principais e mais importantes formas de diagnóstico utilizados na hanseníase. Além disso, a reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) tem se mostrado uma metodologia útil no auxílio do diagnóstico dos pacientes com hanseníase. Esta metodologia é utilizada para a detecção do *M. leprae* a partir de amostras clínicas, como: sangue, lesões cutâneas, nervo e muco nasal, baseado na amplificação de regiões específicas do DNA do bacilo. Este teste diagnóstico é muito empregado no monitoramento de contatos, das rotas de transmissão do bacilo e identificação de cepas resistentes à rifampicina e dapsona com base em mutações genéticas (Martinez et al., 2014; Barbieri et al., 2019).

Outra metodologia adicional utilizada é o teste sorológico realizado pelo ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de anticorpos IgM (imunoglobulina M) anti-PGL-I, antígeno da parede celular do *M. leprae*. Ao identificar a presença

desses anticorpos, é possível classificar os pacientes em PB ou MB, visto que títulos elevados de anticorpos são encontrados em pacientes MB em comparação a pacientes PB que apresentam títulos baixos ou ausentes. Embora a sensibilidade desse teste tenha sido de 80-95% nos casos de MB, a sensibilidade foi baixa para a detecção de casos de PB (0-40%) (Spencer; Brennan, 2011; Stefani et al., 2012). Os títulos de anticorpos podem ser usados para monitorar a eficácia do tratamento e avaliar a progressão da doença em indivíduos de alto risco, mas a identificação da hanseníase precoce/latente é um limitante da técnica (Nath et al., 2015; Reibel et al., 2015).

O teste de Mitsuda consiste na injeção intradérmica de fragmentos do *M. leprae* morto pelo calor e ressuspenso em solução de cloreto de sódio que é conhecida como lepromina. Este teste tem valor prognóstico e avalia a resposta imune celular do indivíduo pela observação de uma reação local (Mitsuda) feita após 4 semanas. Após esse tempo, a leitura é realizada e se houver o aparecimento de pápula maior que 5 mm, o resultado é positivo. Os pacientes PB possuem resultado positivo, já os pacientes MB apresentam resultado negativo (Beiguelman; Quagliato, 1964; Sengupta, 2018).

1.1.7. Tratamento

O tratamento para a hanseníase é realizado por um esquema poliquimioterápico que consiste na associação de três medicamentos orais: Rifampicina, Dapsona e Clofazimina. Essa terapia é realizada de forma supervisionada seguindo as recomendações propostas pela OMS, em 1982, baseado na classificação operacional que divide os pacientes em PB e MB. É recomendado que pacientes PB realizem o tratamento por cerca de 6 meses de duração com dose mensal de 600 mg de rifampicina e doses mensais e diárias de 100 mg de dapsona. E para pacientes MB o tratamento é realizado por um período de 12 meses com dose mensal de 600 mg de rifampicina e doses mensais, diárias de 100 mg de dapsona e 300 mg de clofazimina em doses supervisionada (Lastória; Abreu, 2012; Cruz et al., 2017; Ministério da Saúde, 2019).

Em casos de contra-indicação é adotado um esquema terapêutico alternativo que consiste na administração de doses mensais de 600 mg de rifampicina, 400 mg

de ofloxacina e 100 mg de minociclina por 6 meses para pacientes PB e 24 meses para pacientes MB (Ministério da Saúde, 2010).

1.1.8. Episódios Reacionais

Ao longo do curso natural da hanseníase, alguns pacientes desenvolvem episódios inflamatórios agudos ou subagudos que se sobrepõe ao curso crônico da infecção, conhecido como episódios reacionais ou reações hansênicas. Estes episódios reacionais são caracterizados por uma exacerbação do quadro clínico de forma súbita, com envolvimento cutâneo e/ou sistêmico, surgimento de novas lesões ou reativação das lesões de pele e agravamento do dano neural resultantes de alterações na resposta imunológica do hospedeiro. São dois principais tipos de reações: Reação reversa (RR ou reação do tipo 1) e Eritema Nodoso Hansênico (ENH ou reação do tipo 2) e podem acontecer antes, durante ou após a alta do tratamento específico com a PQT, sendo mais frequente durante a PQT, e contribuem com as deformidades e incapacidades físicas e até morbidade do paciente (Nery et al., 2006; Pandhi; Chhabra, 2013; White; Franco-Paredes, 2015).

A reação reversa, afeta principalmente pacientes com as formas bordelines da hanseníase (BT, BB e BL) e resulta do aumento súbito e espontâneo da resposta imune celular a determinados antígenos do *M. leprae*. É caracterizada por uma inflamação aguda das lesões cutâneas já existentes, podendo surgir lesões novas, associada ou não ao comprometimento da função neural. Clinicamente, são apresentadas por máculas hipopigmentadas em regressão que se tornam vermelhas e inchadas, as vezes escamosas. Pode apresentar edema na face, mãos e pés. As lesões neurais tendem a piorar e os pacientes podem apresentar sensação de queimação, perda da sensibilidade e força muscular e dor nas extremidades e na face. Pode ocorrer manifestação de paralisia facial, anestesia, mãos e pés “em garra” (Walker; Lockwood, 2008; Nery et al., 2013; Andrade et al., 2015)

A histologia dos pacientes que apresentam reação reversa revela um influxo de células mononucleares diferenciados em células epitelióides, edema na derme superficial, granuloma desorganizado e inchado, aparecimento de numerosas células gigantes do tipo Langhans e erosão epidérmica (Massone et al., 2015; Naafs; van Hees, 2016). A imunopatogênese desses pacientes é marcada pelo influxo de células T CD4⁺ e uma forte resposta imune celular do tipo Th1 com altos níveis de óxido nítrico sintase induzido por IFN- γ , IL-2, TNF- α e quimiocina CXCL10.

Também foi observada expressão aumentada de TNF- α , TGF- β e CXCL10 em amostras de lesão de pele (Lockwood et al., 2011; Kamath et al., 2014; Andrade et al., 2015).

O tratamento no Brasil segue os protocolos preconizados pelo Ministério da Saúde, que indica a administração de corticoides orais, prednisona ou dexametasona, por demonstrar ação de supressão da inflamação cutânea (edema e eritema). É recomendado o uso de 1mg/kg/dia de prednisona ou 0,15 mg/kg/dia de dexametasona e conforme a melhora terapêutica, é feito a redução das doses. Não se faz necessário o rompimento do tratamento com a PQT (Ministério da Saúde, 2019).

1.2. Eritema Nodoso Hansênico

O ENH é uma reação inflamatória sistêmica aguda que se desenvolve em pacientes da forma MB, afetando 50% dos pacientes LL e 5-10% dos pacientes BL (Nery et al., 1998). Esta reação é a principal causa de danos permanentes nos nervos periféricos que podem provocar deformidades e incapacidades característica da hanseníase (Nery et al., 1998). Já foi descrito na literatura que pacientes MB com índice baciloscópio ≥ 4 , infecções bacterianas ou virais, vacinação, gravidez e estresse psicológico são considerados fatores de risco significativos no desenvolvimento desta reação (Pocaterra et al., 2006; Kahawita; Lockwood, 2008).

As manifestações clínicas do ENH (figura 1.5A) são caracterizadas pelo aparecimento de nódulos ou pápulas cutâneas ou subcutâneas, eritematosos e doloridos à palpação, que podem ser hemorrágicas ou necróticas e formar bolhas, pústulas ou úlceras (Kahawita; Lockwood, 2008; Naafs; Noto, 2012). Além das manifestações cutâneas, este episódio também pode ser acompanhado de manifestações extra cutâneas ou sistêmicas, como: febre, dores articulares, anorexia, mialgia, queixas nasais, mal-estar geral, queixas visuais, rinite, epistaxe, paniculite, dor e espessamento dos nervos, edema, insônia e depressão (Pocaterra et al., 2006; Polycarpou et al., 2017).

Histologicamente, o ENH apresenta intenso infiltrado perivascular de neutrófilos nas camadas mais profundas da derme e tecido subcutâneo,

frequentemente acompanhada com aglomerados de macrófagos espumosos, com edema do endotélio associado à infiltração de neutrófilos na parede dos vasos. Numerosas células de Langhans na derme e epiderme podem ser comumente encontradas e pode haver presença de eosinófilos, linfócitos e plasmócitos (Mabalay et al., 1965; Massone et al., 2015; Schmitz et al., 2019). Alterações vasculares, como edema, vasculite e angiogênese, podem ser observados no estágio agudo das lesões e diminuídas após o tratamento (Murphy et al., 1986). A presença de neutrófilos na lesão do ENH é considerada uma marca histológica, porém ainda não está claro se os neutrófilos iniciam a reação ou são recrutados para o local pela ação de quimiocinas e citocinas liberadas, figura 1.5B (Schmitz et al., 2019).

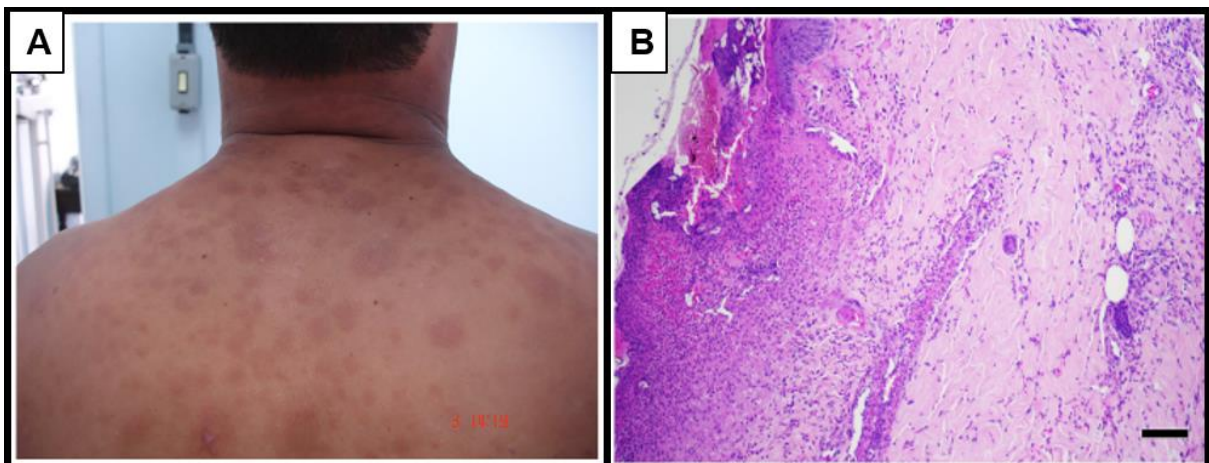


Figura 1.5: Aspecto clínico e histopatológico do ENH. (A) Lesão de pele de paciente com reação do eritema nodoso. (B) Histopatologia da lesão de pele do paciente com ENH. Fonte: Adaptado de Schmitz et al., 2019.

A imunopatologia do ENH vem sendo estudada ao longo das últimas décadas, entretanto, ainda não é evidente como esta reação se inicia. Wemambu e colaboradores (1969) demonstraram uma deposição granular de imunoglobulinas e proteínas do complemento associadas aos fragmentos de bacilos nas lesões de pacientes ENH, próximo aos vasos e ao endotélio onde ocorre os infiltrados neutrofílicos. Isto levou a hipótese de que o ENH é um distúrbio mediado por um complexo antígeno-anticorpo com características de reação de hipersensibilidade do tipo 3 (Wemambu et al., 1969). Um trabalho mais recente observou um aumento na transcrição de RNA mensageiro e da produção da proteína iniciadora da via clássica do complemento C1q em amostras de sangue periférico e lesão cutânea de pacientes com ENH, entretanto, foi visto uma redução de C1q no soro desses

mesmos pacientes. Estes dados sugerem que a proteína C1q circulante pode estar sendo utilizada na formação do complexo imune nesses pacientes, sendo correlacionada com a patologia do ENH (Negera et al., 2018).

Assim como estes, muitos outros trabalhos sugerem a ocorrência de imunocomplexos no ENH, porém nenhum deles suporta evidências de que os imunocomplexos iniciam a reação e alguns estudos demonstram resultados controversos (Anthony et al., 1978; Valentijn et al., 1982; Rojas et al., 1997; Negera et al., 2018).

Outros mecanismos imunopatológicos foram investigados, como o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, o que sugere a atividade da resposta imune celular no desenvolvimento do ENH. O primeiro relato da ação de citocinas pró-inflamatórias mostraram que níveis séricos aumentados de TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6, IFN- γ em pacientes com ENH podem estar associado ao aumento da ativação dos macrófagos e linfócitos T (Sarno et al., 1991; Polycarpou et al., 2017). Entretanto, alguns trabalhos que realizaram dosagem de TNF- α plasmático em pacientes com ENH no início do diagnóstico mostraram níveis baixos, ou não viram diferença, dessa citocina em comparação a pacientes MB, o que contradizem achados anteriores (Haslett et al., 2005; Stefani et al., 2009).

Oliveira e colaboradores (1999) identificaram a produção elevada de níveis de IL-8 e TNF- α em neutrófilos de pacientes MB e com ENH *in vitro* após estímulo com *M. leprae*, sugerindo que os neutrófilos poderiam contribuir para manutenção dos níveis séricos elevados destas citocinas observados durante o ENH (Oliveira et al., 1999). Recentemente, nosso grupo demonstrou que neutrófilos isolados de pacientes ENH foram capazes de produzir espontaneamente níveis detectáveis de TNF- α e a adição de IL-10 bloqueou a liberação desta citocina, o que indica o importante papel dos neutrófilos como células-chave na imunopatogênese do ENH (Pacheco et al., no prelo).

Dias e colaboradores demonstraram que pacientes com ENH apresentaram níveis circulantes elevados de DNA micobacteriano e do hospedeiro, ambos ligantes de receptores do tipo *Toll* 9 (TRL-9). Concomitante, esses pacientes apresentaram expressão aumentada de TLR9 em células mononucleares do sangue periférico e nas lesões de pele quando comparados a pacientes MB não reacionais. Os autores conseguiram demonstrar que as células mononucleares circulantes de pacientes

ENH secretam altos níveis de TNF- α , IL-6 e IL-1 β após estímulo (*in vitro*) com ligantes de TLR9. Por outro lado, inibidores específicos seletivos de TLR9 inibiram a produção das mesmas citocinas, sendo então proposto que a detecção de DNA via TLR-9 seria a principal via de imunidade inata a ser ativada durante o ENH (Dias et al., 2016). Recentemente, outro trabalho do mesmo grupo demonstrou que tanto neutrófilos circulantes, como os presentes na lesão de pacientes ENH liberam armadilhas extracelulares (NETs, *neutrophil extracellular traps*) sugerindo que neutrófilos poderiam ser a fonte dos níveis elevados de DNA do hospedeiro observados em pacientes ENH (Silva et al., 2019).

Análises de bioinformática após a obtenção do transcriptoma de lesões de pele de pacientes MB com e sem ENH revelou que genes associados à ativação e recrutamento de neutrófilos eram significantemente mais expressos em lesões com ENH (Lee et al., 2010), o que corroborou a hipótese de ser o ENH uma condição imunomediada por neutrófilos (Polycarpou et al., 2017). Em 2016, Schmitz e colaboradores demonstraram que quanto maior a expressão de CD64 na superfície de neutrófilos circulantes de pacientes ENH, maior era a gravidade destes pacientes. Interessantemente, a expressão de CD64, um marcador de ativação neutrofílica, foi exclusiva no grupo de pacientes ENH o que sugere que essa característica possa ser explorada como um biomarcador do ENH (Schmitz et al., 2016).

Outra molécula proposta como sendo um potencial biomarcador para o ENH foi a pentraxina-3 (PTX3), uma proteína presente exclusivamente no grânulo secundário de neutrófilos e que já foi descrita originalmente descrita como uma molécula induzida por TNF- α e da IL-1 β (Jaillon et al., 2007). Nosso grupo identificou níveis séricos de PTX3 aumentados em pacientes ENH e pacientes MB não reacionais, mas que evoluíram para o ENH (Mendes et al., 2017). Esses resultados indicam que níveis elevados e persistentes de PTX3 em pacientes com MB podem estar associados à ocorrência de ENH, o que aponta o potencial desta molécula de ser um biomarcador preditivo desta reação.

1.2.1. Tratamento para o Eritema Nodoso Hansênico

Sendo considerada uma emergência clínica, o tratamento do ENH pode ser feito com corticóides orais e/ou com a talidomida por períodos prolongados de

meses ou anos (Nery et al., 2006). No Brasil, a primeira escolha como terapia para o ENH é a talidomida, sendo recomendado a administração de 100 a 300 mg/dia de acordo com a gravidade (Ministério da Saúde, 2019).

A talidomida (α -N-[ftalimido] glutarimida) é um composto derivado do ácido glutâmico e é estruturalmente formada por dois anéis amida e um centro quiral, no qual o enantiômero R (+) é associado aos efeitos sedativos e o enantiômero S (-) relacionado aos efeitos teratogênicos já descritos na literatura (Teo et al., 2002; Vargesson, 2015). Este medicamento, sintetizado pela primeira vez em 1953 e amplamente comercializada em 1957 por uma empresa farmacêutica alemã, foi indicado inicialmente como um sedativo hipnótico e antiemético para gestantes e lactantes. Alguns anos depois, foram relatados uma elevada incidência do nascimento de crianças com uma malformação congênita membros superiores, que ficou conhecida como focomelia, sendo então retirada do mercado (Teo et al., 2005).

Em 1965, o médico israelense Jacob Sheskin, prescreveu a talidomida para um paciente com ENH grave que se queixava de dores e insônia. Após a administração, foi verificado uma melhora rápida dos sintomas associados a reação (Sheskin, 1965; Millrine; Kishimoto, 2017). Apesar do efeito teratogênico muito descrito, a talidomida também possui efeito anti-inflamatório, imunomodulador e anti-angiogênico. Estudos iniciais mostraram que o mecanismo de ação anti-inflamatório da talidomida ocorre pela degradação do RNAm e inibição da produção de TNF- α em monócitos humanos estimulados tanto por LPS quanto pelo *M. leprae*, realizados *in vitro* (Sampaio et al., 1991; Moreira et al., 1993). Confirmando esses achados, analisando o soro de pacientes com ENH tratados com talidomida, foi demonstrado uma redução da produção de TNF- α , inibição da infiltração de polimorfonucleares e linfócitos T na derme e diminuição dos sintomas clínicos nesses pacientes (Sarno et al., 1993). Esses dados indicaram que efetividade da talidomida está diretamente relacionada com a inibição do TNF- α .

Apesar da eficácia já demonstrada da talidomida nos pacientes com ENH, a OMS recomenda que a talidomida seja administrada apenas a homens e mulheres na pós-menopausa (OMS, 1998). Para pacientes que não possam fazer uso da talidomida, é recomendado à administração da prednisona, na dose de 1 mg/kg/dia ou dexametasona em dose equivalente (Ministério da Saúde, 2019).

1.3. Angiogênese

Angiogênese é a formação de novos vasos sanguíneos a partir do endotélio dos vasos pré-existentes, que tem como objetivo estabelecer o suprimento sanguíneo para os tecidos após diversos estímulos, como por exemplo: hipóxia, pH baixo, privação de nutrientes, indutores de espécies reativas de oxigênio etc (Agrawal, 2015). Esse processo ocorre durante o desenvolvimento e processos fisiológicos, como por exemplo: no crescimento, ciclo menstrual, exercício pós-resistência, reparo tecidual, bem como durante processos patológicos (por exemplo, inflamação, infecção, isquemia, crescimento de tumores). Esse é um processo complexo com múltiplas etapas que envolvem a migração, proliferação, diferenciação e adesão de diferentes tipos celulares (células endoteliais, pericitos e células musculares lisas), com participação de componentes da matriz extracelular (MEC), enzimas como proteases, bem como muitas citocinas e é iniciada pelo VEGF-A (Carmeliet, 2003; Potente; Carmeliet, 2017).

1.3.1. Angiogênese induzida por processos inflamatórios

O processo inflamatório pode ser causado por infecções, doenças auto-imunes, tumores ou outras condições patológicas e resulta na infiltração e ativação de células imunes no tecido lesionado causando a liberação de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Já foi descrito na literatura que a inflamação tecidual leva ao aumento da demanda metabólica por macrófagos e neutrófilos recrutados superando a disponibilidade de oxigênio (O_2), gerando uma hipóxia tecidual (diminuição dos níveis de O_2 nos tecidos) que leva ao acúmulo de fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF-1 α) desencadeando a transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas na angiogênese (Forsythe et al., 1996; Eltzschig; Carmeliet, 2011).

O HIF-1 é um fator de transcrição heterodimérico composto por duas subunidades: uma subunidade sensível ao oxigênio, HIF-1 α , e uma subunidade constitutivamente ativa HIF-1 β (conhecida como ARNT), que são degradadas via ubiquitinação em condições normais. Sob condições hipóxicas, as proil hidroxilases são inativadas, fazendo com que o HIF-1 α se torne estável e se transloque do citoplasma para o núcleo, se ligando ao HIF-1 β , formando um complexo ativo do

HIF-1 (Eltzschig, Carmeliet, 2011; Semenza, 2012). Já foi descrito *in vivo* que a inflamação é desencadeada pela ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) em macrófagos de camundongo, o que resulta na regulação positiva de HIF-1 α e contribui para a liberação de VEGF-A no tecido (Rius et al., 2008). Também foi demonstrado *in vitro* por Walmsley e colaboradores que neutrófilos humanos e de camundongo em condições hipóxicas expressam HIF-1 α , o que contribui para o aumento da transcrição do NF- κ B, resultando na inibição da apoptose destas células (Walmsley et al., 2005). O HIF-1 α ao induzir a transcrição do VEGF-A, promove a migração das células endoteliais precursoras e o recrutamento de células mieloides em direção à área hipóxica, sendo então considerado o principal indutor de angiogênese (Forsythe et al., 1996; Heikal et al., 2018; Marsboom; Rehman, 2018).

Após o estímulo angiogênico desencadeado pelo HIF-1 α , a ativação do VEGF-A inicia o processo de angiogênese que ocorre por meio da regulação de múltiplas etapas simultaneamente, como observado na figura 1.6. O VEGF é uma família de glicoproteínas sinalizadoras composta por 5 membros, VEGF-A, B, C, D e PlGF (fator de crescimento placentário), que regulam a angiogênese (Suto et al., 2005; Shibuya, 2013). O VEGF-A estimula a permeabilidade do vaso sanguíneo, a proliferação e a regulação de receptores de células endoteliais durante o processo de angiogênese (Primo et al., 2010). O VEGF-A se liga aos seus receptores tirosina-quinases (VEGFR1 e VEGFR2) localizadas na superfície das células endoteliais vasculares, desencadeando uma cascata de vias de sinalização intracelular que dão início a angiogênese (Semenza, 2001).

Após a liberação de VEGF-A e angiopoetina-2 (ANG-2) no meio extracelular, os pericitos sofrem ação das MMPs e se destacam da parede vascular levando a fenestração da membrana basal (Kang et al., 2019). Pericitos, também chamados de células murais, são células perivasculares fixadas a membrana basal que envolvem os capilares sanguíneos e se comunicam com células endoteliais por meio de contato físico e vias de sinalização parácrinas a fim de estabelecer a manutenção e formação de vasos sanguíneos (Bergers; Song, 2005). Uma via de comunicação entre células endoteliais, que já foi demonstrada *in vitro*, é a liberação de fator de crescimento derivado de plaquetas B (PDGF-B) por estas células se ligando ao receptor beta do PDGF (PDGFR β) expressos na superfície dos pericitos (Hellström et al., 1999).

O PDGF é composto por uma família de fatores de crescimento de polipeptídeos que se ligam à heparina, denominados PDGF-A, B, C e D e que se ligam a dois receptores tirosina-quinases distintas, PDGFR α e PDGFR β . As isoformas PDGF-A e PDGF-B formam tanto heterodímeros quanto homodímeros, resultando na isoforma PDGF-AB. Este fator de crescimento afeta diversas células, como fibroblastos, pericitos, células musculares lisas, células gliais, entre outras (Heldin et al., 2002). Um estudo em modelo murino identificou que a via PDGF-AA/PDGFR α em fibroblastos e células do músculo liso vascular era essencial para a angiogênese tumoral *in vivo* e que o PDGF-AA, que não tem como alvo as células endoteliais vasculares, regula predominantemente a expressão do VEGF, contribuindo essencialmente para o processo angiogênico *in vivo* (Tsutsumi et al., 2004). Estudos subsequentes mostraram *in vitro*, em modelo de câncer de pulmão, que a expressão de PDGF-A regula a expressão de VEGF por uma via autócrina neste modelo e expressão desta molécula pode ser usado como indicador de prognóstico para pacientes com carcinoma pulmonar (Shikada et al., 2005).

Já foi descrito na literatura que VEGF-A liberado no tecido hipóxico contribui para o recrutamento de neutrófilos pró-angiogênicos que expressam VEGFR1 na superfície e altos níveis de MMP-9, o que promove a degradação da MEC (Christoffersson et al., 2019). A degradação da MEC facilita a migração das células endoteliais, além de liberar outros fatores angiogênicos, como VEGF-A, EGF, fator de crescimento epidérmico, induzindo a formação de um tubo através da migração e proliferação de células endoteliais seguindo um gradiente de concentração. Os sinais angiogênicos desencadeados pela liberação de VEGF-A e ativação da sinalização de Notch, fazem com que ocorra a diferenciação das primeiras células endoteliais em um tipo celular conhecida como “células da ponta” que é selecionada para liderar a ponta na presença de fatores como receptores VEGF e neuropilinas (NRPs) (Gerhardt et al., 2003; Jakobsson et al., 2010). A VE-caderina e as integrinas coordenam a ligação da célula endotelial, enquanto o TNF- α , FGF e PDGF-B induzem a formação de tubos (Lampugnani, 2010).

Sob a influência de sinais como PDGF-B, ANG-1, TGF- β , as células endoteliais se apertam, os pericitos são recrutados e uma nova membrana basal é gerada. Em condições normais, inibidores de proteases conhecidos como inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs) e inibidor ativador do plasminogênio-1 causam a deposição de uma membrana basal, e as junções são restabelecidas para

garantir a distribuição ideal do fluxo (Agrawal, 2015; Heikal; Ferns, 2017). As etapas da angiogênese está representada na figura 1.6 abaixo:

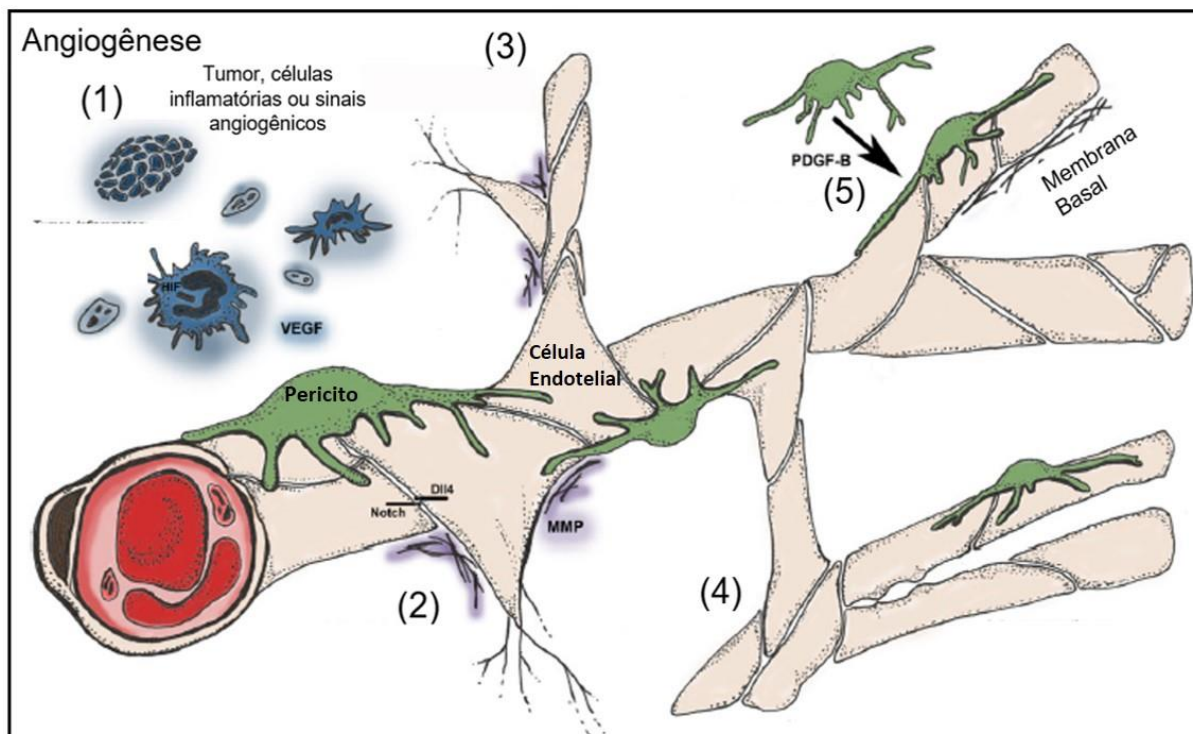


Figura 1.6: Etapas do mecanismo de formação de novos vasos (angiogênese). (1) estímulo angiogênico, (2) brotamento endotelial, (3) ramificação e alongamento vasculares, (4) formação e anastomose do lúmen e (5) maturação dos vasos. VEGF- fator de crescimento endotelial vascular; PDGF- fator de crescimento derivado de plaquetas; MMP- metaloproteínase de matriz. Fonte: Adaptado de Logsdon et al., 2014.

A formação de novos vasos pode ser benéfica para o organismo, pois garante a homeostase como já descrito no reparo tecidual por cicatrização, no entanto, quando ocorre de forma excessiva pode ser prejudicial, podendo contribuir para a formação da fibrose (Elpek, 2015). Na artrite reumatoide, a angiogênese pode promover a infiltração de células inflamatórias nas articulações levando à hiperplasia sinovial e a destruição óssea progressiva (Szekanecz; Koch, 2008). Liu e colaboradores observaram no soro de pacientes com lúpus sistêmico eritematoso um aumento de VEGF-A e outras citocinas angiogênicas e baixos níveis de TGF- β , mostrando que a angiogênese faz parte do processo patológico do lúpus eritematoso (Liu et al., 2015).

Já foi descrito na literatura que no câncer, a hipóxia é o principal mecanismo, porém não o único, que aciona o mecanismo de angiogênese fazendo com que

ocorra a progressão e formação tumoral com potencial metastático (Szade et al., 2015). Na tuberculose, Husain e colaboradores demonstraram um aumento dos níveis de VEGF-A no soro e no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite tuberculosa ativa sendo correlacionada com a alta expressão de VEGF-A pelas células que compõe o tuberculoma (Husain et al., 2008). Também foi apontado a redução dos níveis de VEGF-A conforme ocorreu a administração da terapia antituberculosa. Na hanseníase, pesquisadores demonstraram que o aumento da angiogênese na lesão está associada ao aumento da carga bacilar do paciente, seguindo a direção do polo LL do espectro hansênico (Bhandarkar et al., 2007).

2. JUSTIFICATIVA:

Os episódios reacionais da hanseníase têm como característica a exacerbação do quadro clínico de forma súbita, com envolvimento cutâneo e/ou sistêmico e agravamento do dano neural resultantes de alterações na resposta imunológica do hospedeiro. A lesão neural da hanseníase pode ser irreversível e é responsável pelas deformidades e incapacidades físicas dos pacientes. A ampliação do conhecimento acerca dos mecanismos imunopatológicos dos episódios de ENH pode servir de base para o desenvolvimento de novos medicamentos e testes diagnósticos a fim de se evitar o exacerbamento das lesões neurológicas associadas à hanseníase.

Na hanseníase, por meio das análises histológicas, pesquisadores demonstraram que o aumento da angiogênese, pela contagem de vasos sanguíneos marcados com CD31 (marcador de célula endotelial) na lesão está associado com o aumento da carga bacilar do paciente, seguindo em direção ao polo LL do espectro (Bhandarkar et al., 2007). Soares e colaboradores demonstraram significativamente uma maior quantidade de novos vasos, pela marcação de CD105 (principal marcador de endotélio de novos vasos), em pacientes com forma clínica MB e em pacientes com reação do ENH comparados com pacientes com forma indeterminada e indivíduos controles sadios (Soares et al., 2013). Já no eritema multiforme da hanseníase, outro episódio reacional classificado como reação do tipo 2, o nosso grupo demonstrou pela análise morfométrica, a presença de uma grande quantidade de novos vasos nas lesões ativas comparadas à pele antes do episódio de reação e

após a remissão da lesão (Miranda et al., 2012). Entretanto, os mecanismos celular e molecular da formação de novos vasos no ENH ainda não estão claro na literatura.

Recentemente, um estudo identificou na circulação, em camundongos e humanos, uma subpopulação de neutrófilos CD49d⁺ que expressavam altos níveis de VEGFR1 e CXCR4, sendo recrutados para o tecido pelo VEGF-A, sugerindo assim que estas células estejam estimulando a angiogênese no local de hipóxia (Massena et al., 2015).

Sabendo que as lesões ENH são sobrepostas às lesões multibacilares, e que os neutrófilos na lesão ENH podem ser considerados uma assinatura, a nossa hipótese é que a migração de neutrófilos para a lesão resultaria na depleção de O₂ nos tecidos (hipóxia inflamatória) levando a indução de angiogênese no ENH.

3. OBJETIVOS:

Avaliar a participação de marcadores angiogênicos na imunopatogênese da hanseníase.

3.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.1.1. Analisar os níveis proteicos de VEGF-A e PDGF-BB no soro de pacientes com hanseníase;
- 3.1.2. Comparar a expressão de VEGFR-1 na superfície de neutrófilos circulantes de pacientes com hanseníase;
- 3.1.3. Analisar a expressão gênica de *HIF-1A*, *ITGB3*, *VEGF-A*, *PDGF-A* em lesões de pele de pacientes com hanseníase.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. Ética:

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz CEP IOC/Fiocruz (CAAE 56113716.5.0000.5248) (**Anexo A**). Todos os pacientes incluídos no estudo foram recrutados no Ambulatório Souza Araújo (ASA - Centro de Referência em tratamento e diagnóstico de Hanseníase – FIOCRUZ) e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da coleta das amostras. Critério de inclusão: pacientes entre 18 e 70 anos diagnosticados com hanseníase pela primeira vez. Critério de exclusão: pacientes menores de 18 anos, maiores de 70 anos, coinfectados com o vírus da imunodeficiência adquirida, grávidas ou com suspeita de gravidez, que fizeram uso de drogas, que fizeram tratamento com fármacos imunossupressores ou citotóxicos e que possuíam histórico de doença autoimune ou imunossupressoras.

4.2. População de estudo:

Estudo caso-controle com cohort de pacientes com hanseníase atendidos no ASA. Os pacientes foram submetidos à avaliação clínica dermatológica e neurológica e caracterizados de acordo com a classificação de Ridley e Jopling. Para atingir nossos objetivos, categorizaremos os pacientes segundo os critérios utilizados na classificação de Ridley e Jopling (1966). Foram selecionados para este estudo: 1) amostras de pacientes borderline lepromatoso (BL) ou lepromatoso (LL) sem sinais de reação no diagnóstico de hanseníase antes da PQT (grupo BL/ LL); 2) de pacientes boderline tuberculóide (BT) sem sinais de reação no diagnóstico antes da PQT e 3) de pacientes BL/LL que desenvolveram reação de Eritema Nodoso (ENH) coletadas no momento do diagnóstico da reação, sendo chamados de pacientes ENH. Os pacientes ENH retornaram 7 dias após o início do tratamento com talidomida (100-300 mg/dia) para uma nova coleta de amostras biológicas (ENH Tal). Os controles foram selecionados dentre os pacientes com hanseníase com a mesma classificação clínica dos pacientes ENH, mas que não tiveram reação no momento do diagnóstico inicial (LL), pacientes BT não reacionais e, em alguns casos, doadores sadios (DS). As informações dos pacientes e dos indivíduos sadios que fizeram parte do estudo se encontram na tabela 4.1, abaixo:

Tabela 4.1: Características demográficas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo.

Características	BT	LL	ENH	ENH Tal	DS
Nº de indivíduos:	13	28	23	13	3
Gênero	M= 9	M= 26	M= 21	M= 11	M= 1
	F= 4	F= 2	F= 2	F= 2	F= 2
Média de Idade	52	41	44	41	30
(mín. e máx.)	(23-70)	(19-69)	(23-73)	(23-64)	(25-40)
Média de IB	0	4,9	4,76	4,75	N/A
(mín. e máx.)		(2,6-5,75)	(2,6-5,75)	(2,6-5,75)	
Média de ILB	0	5,06	3,92	3,33	N/A
(mín. e máx.)		(2,3-5,95)	(2,8-4,9)	(1,5-4,85)	
ELISA	6	17	14	8	0
Citometria de Fluxo	2	4	5	4	3
RT-qPCR	6	12	9	4	0

Legenda: BT = Boderline-tuberculóide, LL = Paucibacilares, ENH = Eritema Nodoso Hansênico, ENH Tal = Eritema Nodoso Hansênico após 7 dias de talidomida, DS = Doadores Sadios, M = Masculino, H = Feminino, IB = Índice baciloscópio, ILB = Índice Baciloscópio da Lesão, Nº de indivíduos= número de indivíduos, N/A = Não se Aplica, RT-qPCR = reação em cadeia de polimerase pela transcrição reversa quantitativa em tempo real.

4.3. Escala de gravidade do ENH:

De acordo com a sintomatologia e evidências de comprometimento da função nervosa, os pacientes com ENH foram classificados clinicamente em ENH leve, moderado e grave, de acordo com a pontuação obtida ao final do preenchimento do formulário de escala de gravidade ENLIST ENL, conforme (Walker et al., 2016). Resumidamente, os dados dos pacientes ENH recrutados para o estudo foram preenchidos de acordo com o formulário de escala de gravidade ENLIST ENL (**Anexo B**) e ao final, foi realizada a soma dos pontos obtidos. Ao término do cálculo, os pacientes ENH foram divididos em 2 grupos: indivíduos que somam até 8 pontos são classificados como ENH leve e indivíduos que apresentam soma maior que 9 pontos ou mais são classificados em ENH moderado/grave, como demonstrado na tabela 4.2.

Tabela 4.2: Características demográficas e clínicas dos pacientes ENH incluídos no estudo.

PACIENTES	IDADE	GÊNERO	FORMA CLÍNICA	GRAVIDADE	ENSAIO
1	64	M	ENH		Citometria
2	46	M	ENH		Citometria
3	73	M	ENH	GRAVE	ELISA
4	31	M	ENH	LEVE	ELISA
5	47	M	ENH		ELISA
6	39	M	ENH		RT-qPCR
7	45	M	ENH	LEVE	ELISA
8	44	M	ENH	LEVE	Citometria E RT-qPCR
9	35	M	ENH		ELISA E RT-qPCR
10	34	M	ENH	LEVE	ELISA E RT-qPCR
11	33	M	ENH		ELISA E RT-qPCR
12	34	M	ENH	GRAVE	ELISA
13	52	M	ENH	LEVE	ELISA
14	34	M	ENH	GRAVE	ELISA E RT-qPCR
15	38	M	ENH	MODERADO	ELISA E RT-qPCR
16	69	M	ENH	LEVE	ELISA
17	50	M	ENH		RT-qPCR
18	48	M	ENH	LEVE	ELISA
19	32	M	ENH		ELISA
20	65	M	ENH		RT-qPCR
21	49	F	ENH		RT-qPCR
22	37	F	ENH		Citometria
23	23	M	ENH		Citometria

Legenda: M= Masculino, F = Feminino, ENH = Eritema Nodoso Hansênico, RT-qPCR = reação em cadeia de polimerase pela transcrição reversa quantitativa em tempo real, ELISA = ensaio imunoenzimático.

4.4. Amostras clínicas:

Fragmentos da lesão de pele extraídos por biópsia (com *punch* de 6 mm de diâmetro) e sangue periférico foram coletados dos participantes da pesquisa de acordo com os critérios estabelecidos acima. Os fragmentos da biópsia da lesão de pele foram armazenados em nitrogênio líquido para posterior utilização nas técnicas de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) e imunofluorescência. O sangue foi processado, conforme o protocolo abaixo, para obtenção de soro e neutrófilos para utilização no ensaio imunoenzimático (ELISA) e citometria de fluxo, respectivamente. Os dados clínicos foram coletados dos prontuários.

4.5. Processamento do sangue para obtenção do soro:

Foram coletados 10 mL de sangue periférico sem anticoagulantes. Após aguardar os 10 minutos, o sangue foi centrifugado por 10 minutos a 900 *xg* a temperatura ambiente. O soro foi coletado e as alíquotas de 500 μ L foram armazenadas a -20°C para posterior utilização.

4.6. Ensaio Imunoenzimático (ELISA):

Foi feita dosagem dos níveis séricos dos marcadores angiogênicos VEGF-A e PDGF-BB (Peprotech) nas amostras de soro conforme orientação do fabricante. Placas de 96 poços de ELISA foram revestidas com 50 μ L de anticorpos de captura anti-VEGF-A ou anti-PDGF-BB e foram incubadas na geladeira (4°C) por 18 horas. Após lavagem das placas com tampão indicado pelo fabricante, foi feito bloqueio da placa com 1% de albumina sérica bovina (BSA) em tampão fosfato (PBS) por 1 hora de incubação. Após, foi realizado uma nova lavagem e adição de 50 μ L dos soros nos poços destinados as amostras. Em paralelo, o recombinante do VEGF-A ou PDGF-BB foi adicionado aos poços para geração da curva-padrão (16-1000 pg/mL). O tempo de incubação foi de 2 horas em temperatura ambiente. Após um novo ciclo de lavagem, adicionamos o anticorpo de detecção biotilado anti-VEGF-A ou PDGF-BB. A reação foi revelada pela adição da estreptavidina-peroxidase e após a incubação necessária e lavagem foi adicionado o substrato TMB (3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina) até que a curva atingisse a coloração indicada. A reação foi finalizada com adição de HCL 1 N nos poços. As placas foram lidas no leitor de ELISA (Spectra Max 190, Molecular Devices, Thermo Scientific) no comprimento de onda 405 nm. A análise da curva-padrão e a obtenção dos valores das citocinas foram realizados no programa Softmax Pro 6.0 (Molecular Devices).

4.7. Processamento do sangue para obtenção dos neutrófilos:

A manipulação do material biológico foi feita na câmara de fluxo laminar em ambiente estéril, respeitando as normas de precauções para a manipulação de material biológico. O sangue periférico heparinizado foi diluído 1:1 em tampão fosfato (PBS) para separação das células por gradiente de densidade em Ficoll-

Hypaque (GE Healthcare) e centrifugado a 900 *xg*, por 30 minutos à temperatura de 25°C. Após a centrifugação, ocorreu o fracionamento do sangue em 3 perfis distintos. No pellet de células vermelhas obtidas após a centrifugação foi adicionado solução de lise de eritrócitos ACK (1,7 M de NH₄Cl, 0,1 M de KHCO₃ e 1 mM EDTA) durante 10 minutos para remoção das células vermelhas. Em seguida foi feita duas centrifugações na velocidade de 500 *xg*, por 10 minutos a 4°C. Em seguida, o pellet contendo os neutrófilos foi lavado em PBS (500 *xg*, por 10 minutos a 4°C) e as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 e uma pequena alíquota dessa suspensão celular foi diluída em azul de Trypan (1:20) (Bio WHITTAKER) e foi avaliada em câmara de Neubauer para a estimativa da concentração de células viáveis. As células foram mantidas à 4°C e distribuídas nos experimentos.

4.8. Avaliação do grau de pureza das preparações de neutrófilos:

Para a preparação de lâminas de cytopsin, amostras contendo 500.000 neutrófilos frescos foram submetidas à citocentrifugação em Cytospin a 60 *xg* durante 6 minutos, e subsequentemente as células aderidas às lâminas foram coradas utilizando o Kit para coloração diferencial Panótico Rápido (Laborclin – solução de triarilmetano a 0,1%, xantenos 0,1% e tiazinas 0,1%). Ao final na coloração, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico de campo claro para análise da morfologia celular.

4.9. Citometria de Fluxo:

A suspensão de neutrófilos foi fixada com paraformaldeído 4%. As células fixadas foram armazenadas à 4°C até o momento da realização da coloração. Os neutrófilos fixados (1 milhão de células para cada amostra analisada) foram centrifugados a 500 *xg* por 5 minutos a 4°C em tampão PBS. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensado em 10 µL em solução de bloqueio com PBS/ BSA 1% + 5% soro humano inativado por 30 minutos. Em seguida foi adicionado o tampão de lavagem (PBS/BSA 1%), seguido de marcação com anti-VEGFR1 humano IgG policlonal de cabra (AF321, R&D systems) conjugado anteriormente, conforme orientação do fabricante, com o kit de marcação de

anticorpo Alexa Fluor 647 (A20186, Molecular Probes Alexa Fluor) e com o anticorpo anti-CD66b humano IgM monoclonal de camundongo (Alexa Fluor 700 – G10F5, Biolegend), em um volume final de 50 μ L. Foi realizado um controle de fluorescência para definir o ponto de corte (FMO - Fluorescence Minus One Control), onde foi adicionado somente o marcador de grânulo de neutrófilos CD66b em um volume final de 50 μ L. Após o período de incubação do anticorpo as células foram lavadas com 200 μ L de tampão de lavagem, centrifugadas (400 xg por 5 minutos à 4°C) e o sobrenadante foi descartado foram fixadas em paraformaldeído 4% (PFA) durante 10 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas novamente e ressuspensas em 200 μ L tampão contendo PBS + BSA 1%. As amostras foram armazenadas e protegidas da luz e mantidas à 4°C até o momento da leitura. As amostras foram adquiridas no citômetro BD FACSAria (BD Biosciences) da Plataforma Tecnológica da Fiocruz/IOC (RPT08A - Citometria de Fluxo - RJ). Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra dentro da região de granulócitos utilizando os parâmetros *Side Scatter* (SSC) \times *Forward Scatter* (FSC). Os dados da citometria foram analisados utilizando o programa FlowJo (BD Systems) e as células mortas foram excluídas por meio do *gate*.

4.10. Extração e tratamento de RNA:

As amostras das lesões de pele dos pacientes foram homogeneizadas com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (POLYTRON® PT-3100D – Kinematica AG) e a extração de RNA total foi realizada com 50 mg de tecido para 1 mL de reagente TRIzol®. Após, foi adicionado 200 μ L de clorofórmio (Merck) em cada tubo de 1,5 mL, livre de DNase/RNase, depois foram homogeneizados por inversão até que fique um aspecto leitoso. Posteriormente, os tubos foram centrifugados a 12.000 xg por 15 minutos à 4°C. A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para outro tubo e a fase orgânica estocada para posterior extração das proteínas. Foram adicionados 500 μ L de isopropanol à fase aquosa, homogeneizado por inversão suave 1-2 vezes e as amostras foram incubadas por 16 horas à -70°C para precipitação do RNA. Após a precipitação do RNA, foi adicionado 1 μ L de GlycoBlue (Ambion), para marcação do sedimento e as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas a 12.000 xg por 30 minutos à 4°C, o sobrenadante descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 75% (preparado em água livre de RNase

tratada com dietilpicrocarbonato - DEPC) em centrifugação a 7.500 g por 5 minutos à 4°C. Em seguida, os sobrenadantes foram removidos, os sedimentos secos à temperatura ambiente por cerca de 1 hora e, posteriormente, ressuspensos em 10 μ L de água destilada ultrapura, livre de DNase/RNase (Life Technologies). As amostras foram estocadas à -70°C para a próxima etapa. Na etapa seguinte, as amostras de RNA extraídas foram integralmente submetidas ao tratamento para a remoção de eventuais contaminantes de DNA utilizando a enzima DNase do kit TURBO DNA-free (Ambion). Foram adicionados a cada amostra 3 μ L de tampão 10x contido no kit, 1 μ L de enzima DNase TURBO e adicionou-se 6 μ L de água livre de RNase para avolumar até o volume final de reação de 30 μ L. Em seguida, as amostras foram incubadas por 30 minutos à 37°C e então inativadas com 3 μ L de reagente de inativação. Após incubação à temperatura ambiente por 5 minutos sob constante agitação, os tubos foram centrifugados a 8.000 g por 1 minuto e o sobrenadante coletado, transferido para um novo tubo de 1,5 mL livre de RNase, e o RNA foi quantificado utilizando o aparelho Nanodrop (ND-100, Thermo Fisher Scientific). As amostras que tiveram ambas as razões $R_{260/280}$ e $R_{260/230}$ entre 1,8 e 2 foram consideradas de boa qualidade e seguiram para a análise.

4.11. Avaliação da integridade do RNA e Transcrição Reversa:

Após a quantificação de RNA nas amostras, foi feito um gel de agarose 1,2% para determinar a integridade do RNA. O gel 1,2% de agarose foi preparado com agarose ultrapura (Invitrogen) dissolvida em MOPs [ácido 3- (N-morfolino) propano sulfônico] 1x em água livre de RNase tratada com DEPC com auxílio de aquecimento ao microondas. Foram utilizados 400ng de RNA, a estes foram acrescentados 7 μ L de tampão de amostra (azul de bromofenol e xileno cianol 0,3%, formamida 70% e MOPS 2x); 1 μ L de SYBR e 15 μ L água livre de RNase. As amostras foram aquecidas a 65 °C no banho seco por 15 minutos e aplicadas no gel. A corrida foi realizada no gel imerso no tampão MOPS 1x, a 120 V por 1 hora e o gel foi visualizado com a iluminação ultravioleta (U.V.), no transiluminador (MiniBis pro – DNR BioImaging System); foram consideradas integras as amostras com 2 bandas referentes aos rRNAs 28S e 18S e sem rastros. Para a síntese de DNA complementar (cDNA), as amostras de RNA foram reversamente transcritas utilizando o kit “SuperScript III First-Strand Synthesis System” (Life Technologies) de

acordo com as instruções do fabricante. As reações de PCR foram conduzidas usando duplicatas técnicas de 10 ng de cDNA.

4.12. Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real:

Para a avaliação da expressão de genes relacionados à via de angiogênese adotamos a metodologia da reação em cadeia de polimerase pela transcrição reversa quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Os alvos escolhidos foram selecionados a partir do trabalho de Calvo (2018), onde nesse estudo foi realizada reanálise e integração de dados obtidos a partir de dois microarranjos de pele de pacientes MB *versus* ENH depositados no Gen Expression Omnibus (Calvo, 2018). A via da angiogênese foi um dos processos biológicos encontrados que diferenciaram os pacientes ENH *versus* MB. Os dados de calvo apontaram dois alvos diferencialmente expressos nos pacientes ENH: *HIF1A* e *ITGB3*. Baseados em dados da literatura selecionamos mais dois alvos: *VEGF-A* e *PDGF-A*. Os primers para *HIF1A*, *ITGB3*, *VEGF-A* e *PDGF-A* foram desenhados pelo colaborador Thyago Calvo e comprados da empresa Thermo Fisher Scientific. As sequências dos primers encontra-se na Tabela 4.3. A expressão dos genes foi realizada a 95°C por 10 minutos, para ativação da DNA polimerase, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, para a desnaturação da fita, e a 60°C por 1 minuto, para o anelamento do primer e extensão da fita de cDNA, utilizando o “Power SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems). Quando utilizado o “Fast SYBR Green PCR Master Mix” (Applied Biosystems), a expressão dos genes foi realizada a 95°C por 20 segundos, para ativação da DNA polimerase, 40 ciclos a 95°C por 3 segundos, para a desnaturação da fita, e a 60°C por 30 minutos, para o anelamento do primer e extensão da fita de cDNA em um “StepOnePlus qPCR System”, com o auxílio do software StepOne versão 2.3. Foi feito um teste com os genes de referências e o gene que possuiu maior constância de expressão entre os grupos das amostras utilizadas foi escolhido como gene de referência. A análise de expressão gênica foi realizada pela normalização dos dados, calculando primeiramente a eficiência da reação feita pelo software LinregPCR (Ramakers et al., 2003) e a análise de CT comparativo foi realizada considerando as correções de eficiência (Pfaffl, 2001), utilizando como normalizador o gene de referência *RPL13A* (proteína ribossômica

L13A). A eficiência de todas as reações foi calculada. Todas as reações de PCR foram monitoradas para que não houvesse contaminação.

Tabela 4.3: Primers utilizados no estudo.

Gene	Forward (5' para 3')	Reverse (3' para 5')
<i>VEGFA</i>	TGAATGCAGACCAAAGAAAGA	CGTACACGCTCCAGGACTTA
<i>PDGFA</i>	GACACGGGAAGGCCTAGGGAGT	AAAGGGCTGCGGCTCATCCT
<i>HIF1A</i>	TGGCAGCAACGACACAGAAACT	TTGGCGTTTCAGCGGTGGGT
<i>ITGB3</i>	TGCCCAGATGCCTGCACCTTT	TCCTTGCCAGTGTCCTTAAGCTCTTT
<i>RPL13A</i>	GACAAGAAAAAGCGGATGGT	GTACTTCCAGCCAACCTCGT

Legenda: *VEGFA* = fator de crescimento vascular endotelial A, *PDGFA* = fator de crescimento derivado de plaqueta A, *HIF1A* = fator induzido por hipóxia 1 alfa, *ITGB3* = integrina beta 3, *RPL13A* = proteína ribossômica L13A.

4.13. Análise Estatística:

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0 (GraphPad Software). Para comparar os resultados de dois grupos foi utilizado o teste t de student não pareado. Já para comparar mais de dois grupos de amostras não paramétricas, foi utilizado o teste Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn. Para avaliar a capacidade discriminatória de citocina VEGF-A em classificar a forma clínica dos pacientes incluídos no estudo, foi utilizada a análise da curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*). Esta análise identifica o ponto de corte com maior sensibilidade e maior especificidade e considera os dados da área sob a curva (AUC) e intervalo de confiança de 95%. As diferenças foram consideradas significativas a partir de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS:

5.1. Análise de níveis séricos de fatores de crescimento angiogênicos em pacientes com hanseníase (com ou sem ENH):

Dados da literatura mostram que mulheres saudáveis apresentam maior concentração de VEGF-A no soro do que em homens, portanto, neste trabalho decidimos excluir as mulheres na análise do soro (Larsson et al., 2002). A dosagem de VEGF-A por ELISA no soro de pacientes hanseníacos revelou que os LL (mediana = 178,9 pg/mL) apresentavam níveis séricos elevados cerca de 4 vezes (no momento do diagnóstico) quando comparados aos BT (mediana = 44,20 pg/mL) (Figura 5.1A). Análise da curva de ROC foi feita para demonstrar a utilidade da dosagem de VEGF no soro de pacientes com hanseníase capaz de discriminar pacientes BT *versus* LL. Após essa análise obtivemos o valor de AUC = 0,7917 (intervalo de confiança de 95%, 0,5871 a 0,9963; $p = 0,04336$), como demonstrado na figura 5.1B. De acordo com a curva ROC, o ponto de corte que possui melhor acurácia para discriminar pacientes BT de LL é de 105 pg/mL de VEGF-A no soro, com sensibilidade de 78,57% e especificidade de 83,33% (Figura 5.1B).

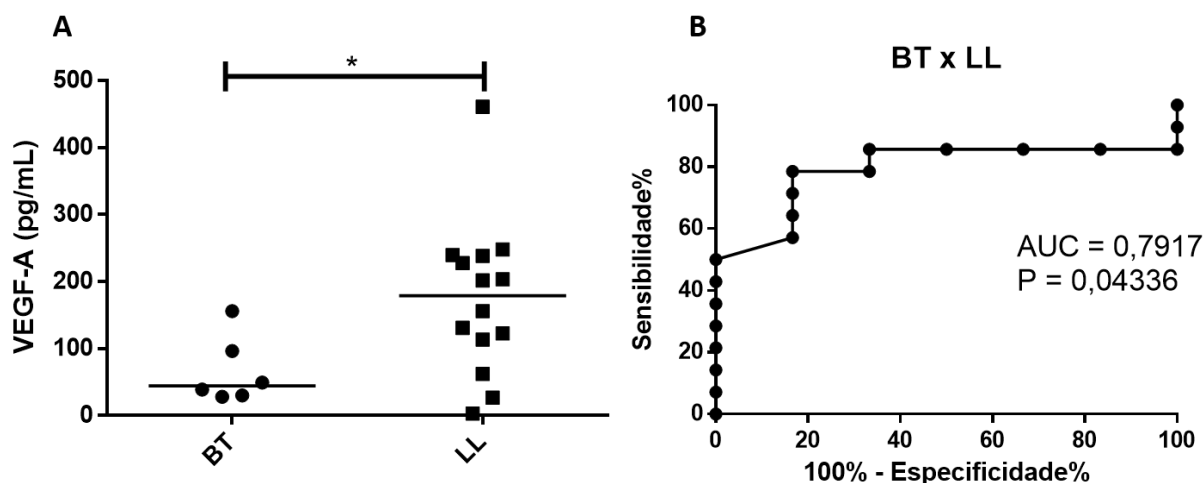


Figura 5.1: Níveis séricos de VEGF-A como potencial biomarcador de hanseníase lepromatosa. (A) Soro de pacientes borderline-tuberculoide (BT- n=6) e lepromatosos (LL n=14) foram dosados pelo método de ELISA. As barras representam mediana e cada símbolo representa um paciente. (B) Curva ROC comparando os níveis séricos de VEGF-A de pacientes BT versus LL. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado na análise (* $p < 0,05$).

Os níveis séricos de VEGF-A foram comparáveis entre pacientes LL com e sem ENH, com níveis medianos de 178,9 e 122,5 pg/mL, respectivamente (Figura 5.2). Não houve diferença nos níveis de VEGF-A entre os pacientes do grupo LL que evoluíram ou não para o ENH, sugerindo que o VEGF-A não é capaz de prever um episódio ENH nos pacientes no momento do diagnóstico de hanseníase. Da mesma forma, não encontramos relação entre os níveis séricos de VEGF-A e a gravidade do ENH. Pacientes ENH que iniciaram tratamento com talidomida 7 dias antes da análise apresentaram níveis séricos de VEGF-A significativamente menores quando comparados com pacientes antes do tratamento anti-reacional (mediana ENHTal = 50,84 pg/mL, **p= 0,0042 e *p= 0,0188) (Figura 5.2).

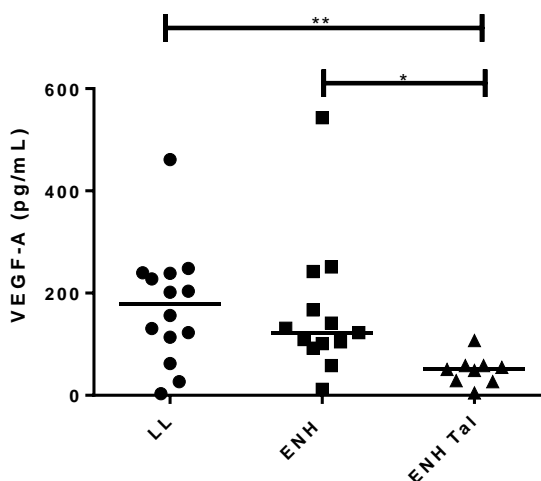


Figura 5.2: Redução dos níveis de VEGF-A em pacientes com ENH após 7 dias do início do tratamento com talidomida. O soro de pacientes lepromatosos (LL n=14), ENH (n=13) e ENH que fizeram uso de talidomida (ENH Tal n=9) foram dosados por ELISA. As barras representam as medianas e cada símbolo representa um paciente. Teste estatístico não paramétrico Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi usado na análise (*p < 0,05, **p < 0,01).

O acompanhamento longitudinal de 5 pacientes (início diagnóstico LL, início diagnóstico ENH e ENH Tal, respectivamente) revelou que os níveis séricos de VEGF-A foram similares em 4 pacientes antes ou após ENH, porém, em um paciente os níveis aumentaram durante a reação (mediana LL = 156,1 pg/mL; ENH = 141,4 pg/mL) (Figura 5.3). O tratamento com talidomida reduziu os níveis séricos em todos os 5 pacientes analisados (mediana ENH Tal = 58,21 pg/mL) (Figura 5.3).

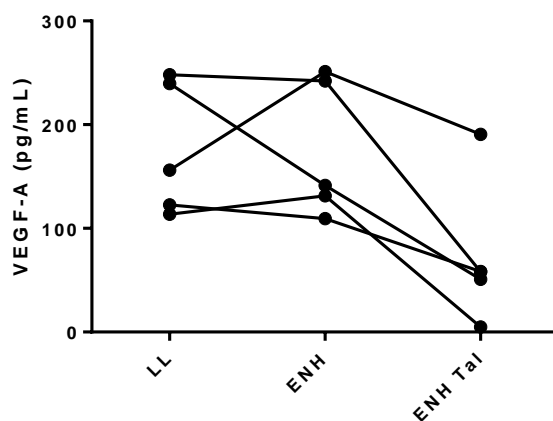


Figura 5.3: Acompanhamento longitudinal dos pacientes LL que progrediram para a reação ENH e foram tratados com talidomida por 7 dias. Concentrações de VEGF-A (pg/mL) foram avaliadas por ELISA no soro de 5 pacientes LL que progrediram para o ENH e após 7 dias do início do tratamento com talidomida.

Em seguida, os níveis séricos de PDGF-BB foram dosados por ELISA. Os nossos resultados revelaram que os níveis sistêmicos de PDGF-BB de pacientes BT e LL foram similares, com valores medianos de 1935 e 2413 pg/mL, respectivamente (Figura 5.4). Nossos resultados não apresentaram diferença estatística, entretanto foi observado que um grupo de pacientes LL apresentam níveis de PDGF-BB elevados, como observado na figura 5.4.

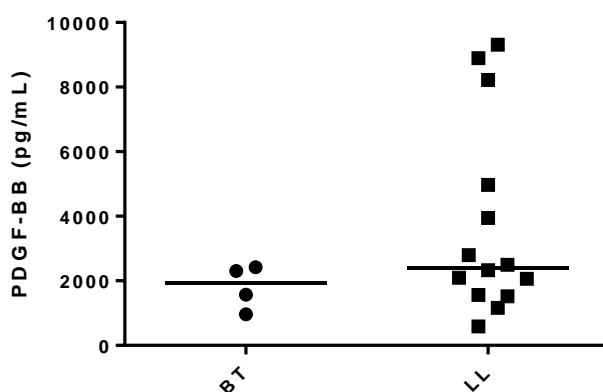


Figura 5.4: Níveis de PDGF-BB no soro de pacientes com hanseníase. O soro de pacientes borderline-tuberculoide (BT n=4) e lepromatosos (LL n=14) foram dosados por ELISA. As barras representam as medianas e cada símbolo representa um paciente. Análise estatística não realizada.

Ao analisarmos os níveis de PDGF-BB no soro de pacientes LL comparados com pacientes ENH (antes e após o tratamento por 7 dias com talidomida), observamos que não houve diferença estatística entre os níveis séricos de PDGF-BB nos 3 grupos de pacientes, sendo observado valores medianos de 2413 pg/mL

no LL, 2901 pg/mL no ENH e 2334 pg/mL no ENH Tal (Figura 5.5). Além disso, também não encontramos relação entre os níveis séricos de PDGF-BB e a gravidade do ENH.

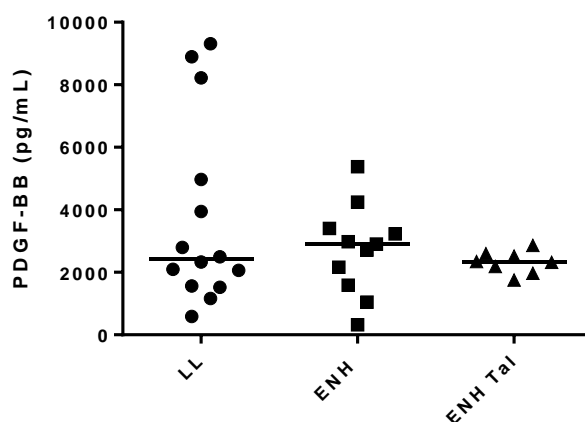


Figura 5.5: Dosagem de PDGF-BB no soro de pacientes com hanseníase e reacionais. Concentrações de PDGF-BB foram avaliadas pelo método de ELISA no soro de 14 LL, 11 com reação do ENH e 8 ENH que fizeram uso de talidomida por 7 dias. O gráfico representa as medianas de cada grupo analisado e cada símbolo representa um paciente. Teste estatístico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn foi usado na análise. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados.

O acompanhamento longitudinal dos 5 pacientes LL que progrediram para o ENH revelou que 2 entre 5 pacientes acompanhados tiveram níveis séricos de PDGF-BB maior durante o ENH (mediana LL = 3948 pg/mL; ENH = 2901 pg/mL; ENH Tal = 2519 pg/mL), entretanto, três dos cinco tiveram níveis diminuídos (Figura 5.6). O tratamento com talidomida não alterou os níveis séricos de PDGF-BB em três pacientes e reduziu em dois (Figura 5.6).

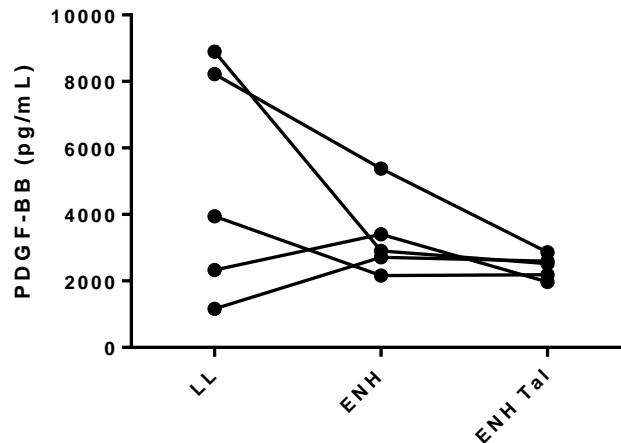


Figura 5.6: Acompanhamento longitudinal dos pacientes LL que progrediram para a reação ENH e foram tratados com talidomida. Concentrações séricas de PDGF-BB (pg/mL) foram avaliadas pelo método imunoenzimático (ELISA) em 5 pacientes LL que progrediram para o ENH e após o tratamento com 7 dias de talidomida. Teste estatístico de Kruskal-Wallis foi usado na análise. Não houve diferença estatística entre os grupos estudados.

5.2. Análise da expressão de VEGFR1 em neutrófilos circulantes de pacientes com hanseníase (com ou sem ENH):

A análise da expressão de VEGFR1 na superfície de neutrófilos foi feita com células purificadas do sangue de pacientes hansenícos. A análise do grau de pureza pela análise morfológica revelou que as nossas preparações apresentavam neutrófilos altamente purificados (Figura 5.7A). Para escolha do *gate* de análise, foi utilizado o parâmetro FSC-H *versus* FSC-A, altura e área, respectivamente, para exclusão de agregados celulares e o *gate* de *singlets* foi selecionado. Dentro desse *gate* fizemos a análise dos parâmetros SSC x FSC na população de neutrófilos, onde a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) e a porcentagem de neutrófilos VEGFR1 positivos foram avaliados (Figura 5.7B). A marcação de grânulos de neutrófilos, o CD66b, (Elghetany, 2002; Naegelen et al., 2015) foi utilizado como controle de fluorescência, FMO (*Fluorescence Minus One Control*) para definir o ponto de corte entre as fluorescências negativas.

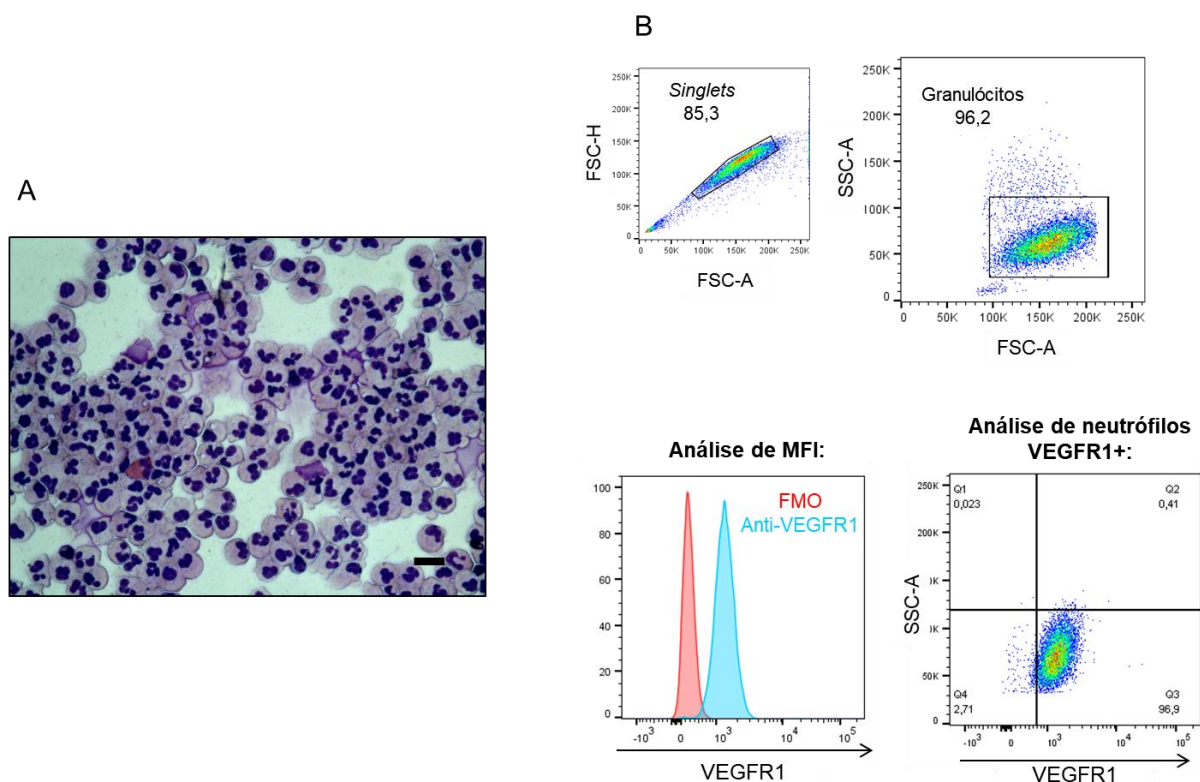


Figura 5.7: Grau de pureza e estratégia de análise da expressão de VEGFR1 em neutrófilos purificados a partir do sangue periférico. (A) Imagem representativa de lâmina de citocentrifugação de neutrófilos purificados de doadores saudáveis (n = 3) corados por Panótico. Aumento de 100x (Barra: 50µm). (B) Estratégia para análise da expressão de VEGFR1 em neutrófilos: *Singlets* – FSX-H x FSC-A, foi realizado a seleção dos *singlets* seguida pela análise dos parâmetro SSC-A x FSC-A para determinação do *gate* de neutrófilos. Dentro desse *gate* analisamos a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) e a porcentagem de neutrófilos VEGFR1 positivos (VEGFR1⁺). A positividade do anticorpo anti-VEGFR1 foi determinada pela estratégia do FMO (*Fluorescence Minus One*), com apenas a marcação de CD66b. Histograma e *dot-plot* representativos de 1 paciente BT.

Nossos dados revelaram que neutrófilos de BT (mediana = 892,5) apresentaram a mediana de intensidade de fluorescência (MFI) para VEGFR1 cerca de 1,6 vezes maior quando comparados com neutrófilos circulantes de LL (mediana = 663,0), entretanto não apresentaram diferença significativamente estatística. Verificamos que neutrófilos de pacientes ENH (mediana = 224,0) apresentaram níveis de MFI abaixo de todos os grupos, inclusive de neutrófilos de doadores sadios (DS; mediana = 513,0) (Figura 5.8A). Não houve diferença na expressão de VEGFR1 entre os grupos de pacientes ENH antes ou 7 dias após o início de tratamento (mediana = 319,5) (Figura 5.8A).

Na figura 5.8B, a análise demonstrou que pacientes BT também apresentaram uma maior porcentagem de neutrófilos VEGFR1⁺ quando comparados a pacientes LL e ENH. Os níveis de neutrófilos VEGFR1⁺ de pacientes ENH foram muito baixos (Figura 5.8B) quando comparados aos grupos analisados. O grupo

ENH Tal apresentou níveis similares ao grupo ENH sem tratamento anti-reacional (Figura 5.8B).

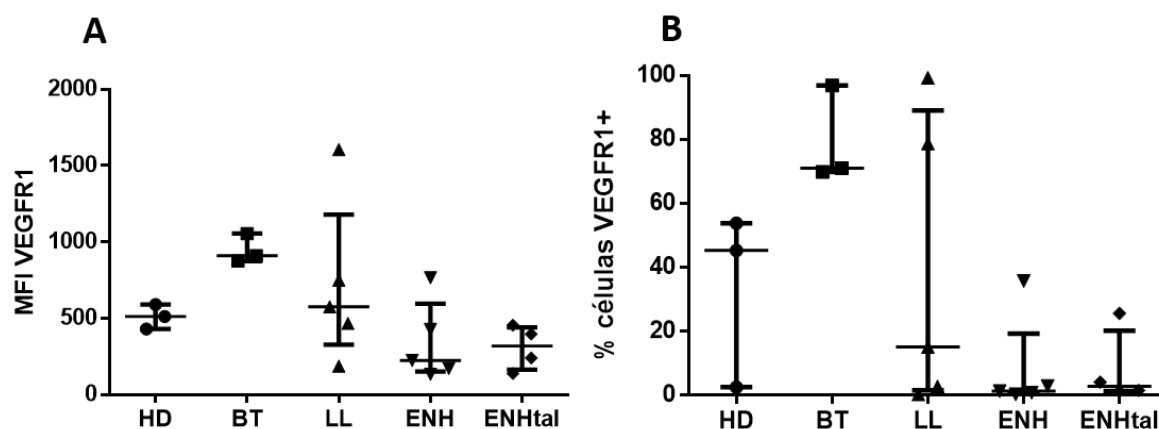


Figura 5.8: Neutrófilos de pacientes com hanseníase apresentam perfil pró-angiogênico. (A) Gráfico comparando MFI VEGFR1 em doadores saudáveis (DS) e pacientes BT, LL e ENH (com ou sem o uso da talidomida). (D) Gráfico de porcentagem de neutrófilos VEGFR1+ nos mesmos pacientes. Foram analisadas amostras de 2 a 5 pacientes por grupo pela Citometria de Fluxo, cada símbolo representa 1 indivíduo. Barra representa a mediana.

5.3. Análise da expressão de genes da via de angiogênese em pacientes com hanseníase (com ou sem ENH):

Nossos resultados mostraram um aumento significativo de cerca de 2,6 vezes da expressão do gene *VEGF-A* na lesão de pele de pacientes com ENH comparados a pacientes LL (* $p= 0,0447$) (figura 5.9A). Um paciente LL que não evoluiu para reação até o momento do estudo foi representado com o símbolo \blacklozenge na figura 5.9A. Entretanto é necessário aumentar o tamanho amostral dessa variável para que possamos mensurar a significância deste dado.

Nossos dados sugerem que as lesões de pele de pacientes com ENH apresentaram uma maior expressão dos genes *HIF1A* (Figura 5.9B) em comparação com os demais pacientes. Dentro do grupo LL, foi observado que 2 pacientes que não evoluíram para a reação ENH, apresentaram menor expressão de *HIF1A* na lesão de pele quando comparadas aos pacientes LL que evoluíram para o ENH. Os pacientes LL que não evoluíram para a reação até o momento do estudo foram representados com o símbolo \blacklozenge na figura 5.9B. Estes resultados não apresentaram diferença estatística, sendo necessário o aumento do tamanho amostral.

Não houve diferença significativa na expressão de *PDGFA* e *ITGB3* entre os pacientes ENH e LL, como observado na figura 5.9C e 5.9D, respectivamente. Na figura 5.9C, é possível observar que 2 pacientes LL que não evoluíram para a reação do ENH até o momento do estudo (representado como ◆), apresentaram menor expressão de *PDGF-A* na lesão de pele quando comparados a pacientes LL que evoluíram, dentro do grupo de pacientes LL. Esses dados não apresentaram diferença estatística.

Também observamos que a lesão de pele de 2 pacientes ENH após 7 dias do início do tratamento com a talidomida indicam uma redução na expressão gênica de *VEGF-A*, *HIF1A*, *PDGF-A* e *ITGB3* comparados a pacientes ENH no início do diagnóstico, entretanto é necessário aumentar o tamanho amostral (Figura 5.9A, 5.9B, 5.9C e 5.9D, respectivamente).

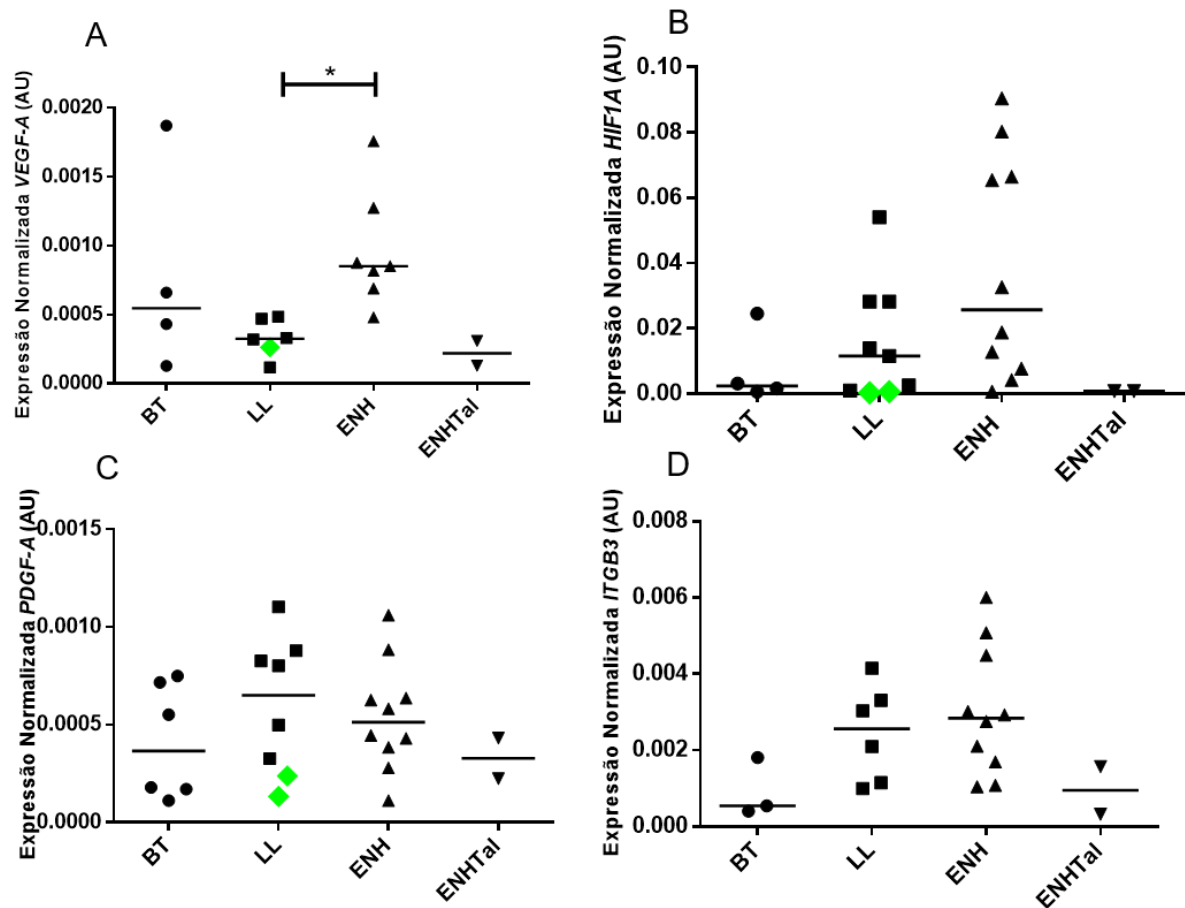


Figura 5.9: Expressão de genes da via de angiogênese em pacientes com hanseníase (com ou sem reação ENH). A expressão dos RNAs mensageiro de (A) *VEGFA* ($n \leq 7$), (B) *HIF1A* ($n \leq 10$) e (C) *PDGFA* ($n \leq 10$) e (D) *ITGB3* ($n \leq 10$) foram avaliadas por RT-qPCR nas lesões cutâneas de pacientes BT, LL que evoluíram ou não para ENH e ENH (antes e 7 dias após o início do tratamento com talidomida). Pacientes LL que não evoluíram para o ENH até o momento do estudo foram representados com o símbolo \blacklozenge . Os dados de expressão gênica foram normalizados com *RPL13A* e os níveis de RNAm são expressos como unidades arbitrárias (AU). O gráfico representa as medianas de cada grupo analisado e cada símbolo representa um indivíduo. Significância estatística foi calculada por teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn (* $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

O ENH é uma reação inflamatória aguda que apresenta um intenso infiltrado neutrofílico perivascular com presença de alterações vasculares muito característicos em sua histopatologia. Ao longo dos anos, alguns trabalhos mostraram a ocorrência das alterações vasculares e angiogênese por análises histológicas da lesão de pele de pacientes LL e com ENH relacionados ao aumento da carga bacilar (Murphy et al., 1986; Antunes et al., 2000; Bhandarkar et al., 2007; Soares et al., 2013). Entretanto, o envolvimento de moléculas angiogênicas na imunopatogênese desses pacientes ainda não está esclarecido. Nosso trabalho observou um aumento significativo dos níveis séricos de VEGF-A em pacientes LL quando comparados a pacientes BT, revelando que os níveis séricos de VEGF-A podem distinguir pacientes LL de BT com sensibilidade de 78,57% e especificidade de 83,33%. Entretanto, não foi possível detectar diferenças entre pacientes LL com ou sem ENH.

O VEGF-A é o principal regulador de angiogênese já bem descrito na literatura, presente em diversos processos fisiológicos e patológicos. A indução deste fator de crescimento ocorre por estímulos hipóxicos e/ou inflamatórios, com a ação do HIF-1A, e leva a ativação de células endotéliais e células imunes a liberação de citocinas e quimiocinas angiogênicas que participam do mecanismo de formação de novos vasos sanguíneos (Benelli et al., 2007; Balogh et al., 2019).

Já foi descrito que macrófagos humanos infectados com *M. tuberculosis* apresentaram uma secreção significativamente aumentada de VEGF *in vitro* e também foi observado uma elevada produção desse fator de crescimento no soro de pacientes com tuberculose pulmonar (Polena et al., 2016). Também já foi demonstrado que níveis plasmáticos de VEGF-A se encontram mais elevados em pacientes com sepse quando comparados a controles saudáveis e este aumento foi associado à gravidade e mortalidade da doença (Van der flier et al., 2005). Na psoríase, um tipo de doença inflamatória crônica, observa-se um aumento significativo nos níveis séricos de VEGF-A em comparação a controles sadios e este aumento está altamente correlacionado a severidade da doença, sendo indicado como um biomarcador de gravidade (Nofal et al., 2009).

Nossos dados demonstraram que não há diferença estatística nos níveis séricos de VEGF-A em pacientes LL e ENH. Stefani e colaboradores demonstraram

que pacientes ENH apresentaram níveis sistêmicos de VEGF-A mais altos quando comparados a pacientes LL não reacionais (Stefani et al., 2009). Entretanto, a dosagem de VEGF-A foi realizada no plasma e no nosso estudo utilizamos o soro, portanto, não é possível fazer essa comparação com os nossos dados.

Nishigaki e colaboradores (2006) observaram que pacientes infectados por *Mycobacterium avium* apresentaram um aumento significativo de VEGF-A no soro associado com a extensão das lesões granulomatosas quando comparados a indivíduos saudáveis e, por análises imuno-histoquímicas, foi descrito que a fonte da liberação desse fator foi encontrada em macrófagos alveolares, células epiteloideas e células gigantes multinucleadas, linfócitos e células epiteliais, o que indicou a contribuição do VEGF-A na patogênese da formação do granuloma nesta infecção. Neste trabalho também foi proposto que os níveis séricos de VEGF-A indicam ser um potencial biomarcador para avaliar a extensão da infecção pulmonar por *M. avium* em pacientes (Nishigaki et al., 2006).

Considerando que pacientes multibacilares possuem um infiltrado monocítico com a participação de macrófagos ativado alternativamente (Montoya et al., 2009; de Sousa et al., 2016) e que estes macrófagos podem se diferenciar em uma subpopulação de macrófagos que apresentam propriedades angiogênicas com a liberação de fatores e citocinas pró-angiogênicas que auxiliam no processo de regeneração tecidual e atividade anti-tumoral (Riabov et al., 2014; Rolny et al., 2011). Esses dados em conjunto com nossos achados mostram que a maior circulação de VEGF-A no soro de pacientes LL comparados a pacientes ENH é resultado da atividade de macrófagos anti-inflamatórios na lesão de pele desses pacientes.

Na sarcoidose pulmonar, uma doença inflamatória granulomatosa, foi identificado que os níveis significativamente elevados de VEGF-A e pró-fibrótico PDGF-AB no soro de pacientes contribui para como marcador da progressão da doença, visto que esses fatores eram mais altos em pacientes com estágios mais avançados (estágio III) comparados a pacientes com estágios iniciais (Tuleta et al., 2018). O PDGF é um fator de crescimento mitógeno, composto por uma família de quatro produtos gênicos e suas isoformas, envolvido na proliferação, no crescimento, diferenciação e quimiotaxia de células mesenquimais, principalmente pericitos, na fase de maturação e estabilização de vasos sanguíneos no processo de

angiogênese (Hellström et al., 2001; Elpek, 2015). Entretanto, o papel do PDGF-BB têm sido melhor descrito no contexto de fibrose (Klinkhammer et al., 2018). Já foi descrito na literatura que pacientes diagnosticados com fibrose pulmonar idiopática, uma condição caracterizada pela exacerbado dano e reparo tecidual, apresentavam níveis de PDGF-BB significativamente elevados quando comparados a pacientes com sarcoidose e controles sadios. Neste mesmo trabalho, foi visto níveis semelhantes de VEGF no soro de pacientes com fibrose pulmonar idiopática e pacientes com sarcoidose comparados ao grupo controle, o que indicou a acentuada atividade pró-fibrótica do PDGF-BB (Ziora et al., 2015).

Recentemente, um trabalho do nosso grupo demonstrou um aumento significativo nos níveis de PDGF-BB no soro de pacientes hansênicos com a forma clínica Neural Pura quando comparados a pacientes não hansênicos (Athaide, 2018). Os resultados do presente estudo demonstraram que não há diferença estatística nos níveis séricos de PDGF-BB em pacientes BT, LL, ENH e pacientes ENH avaliados 7 dias após o início do tratamento com a talidomida. No mesmo trabalho que encontrou o VEGF-A plasmático aumentado em pacientes com ENH, também foi visto PDGF-BB significativamente elevado no plasma de pacientes com ENH comparado com pacientes LL (Stefani et al., 2009).

Ao longo dos anos, muitos trabalhos mostraram o envolvimento de neutrófilos no desenvolvimento e na patogênese do ENH, entretanto não está claro quais são as moléculas envolvidas nesse processo. Já foi descrito na literatura, que em tecidos hipóxicos, neutrófilos recrutados pela liberação de VEGF-A expressam mais MMP-9 do que neutrófilos recrutados por estímulos inflamatórios (Christoffersson et al., 2012). Outro trabalho identificou neutrófilos imaturos (CXCR4⁺) expressando marcadores angiogênicos, CD49d e VEGFR1, sendo recrutados para o tecido pela liberação de VEGF-A no sítio de hipóxia (Massena et al., 2015). Recentemente, Janela e colaboradores demonstraram que infecções bacterianas, com *Propionibacterium acnes in vivo/in vitro* e com *S. aureus*, BCG e *E. coli in vitro*, induzem a secreção de VEGF-A por uma subpopulação de células dendríticas ativadas da pele que induz o recrutamento de neutrófilos VEGFR1⁺ para o tecido e resulta na inflamação local (Janela et al., 2019).

Nosso trabalho identificou pela primeira vez neutrófilos circulantes VEGFR1⁺ em pacientes com hanseníase. Nossos dados sugerem que pacientes ENH

expressam níveis baixos de VEGFR1 (MFI) quando comparados a todos os grupos de pacientes com hanseníase e inclusive aos doadores saudáveis. Além disso, a frequência de neutrófilos circulantes VEGFR1+ foi muito baixa nos 5 pacientes ENH analisados, enquanto nos outros grupos - LL, BT e saudáveis - os valores de mediana da frequência foram entre 45-65%. Apesar do baixo tamanho amostral nos perguntamos se a subpopulação de neutrófilos VEGFR1+ migram para a lesão ENH em função da produção de VEGF-A no sítio da lesão.

Nogueira e colaboradores identificaram um aumento significativo de VEGF-A em células endoteliais presentes na lesão de pacientes hansenícos não reacionais quando comparados à lesão de controles saudáveis (Nogueira et al., 2016). Anteriormente a este trabalho, Fiallo e colaboradores mostraram uma maior expressão de VEGF em células no granuloma (células dendríticas ativadas, epitelioides e endoteliais) da lesão de pele de pacientes com RR quando comparados ao grupo de pacientes não reacionais (Fiallo et al., 2002). Na doença de Crohn, uma doença inflamatória crônica intestinal, observou-se um aumento significativo da expressão gênica de VEGF-A e de PDGF-BB no intestino delgado de pacientes com a doença comparados a controle saudáveis, confirmando que a angiogênese está associada a inflamação tecidual (Knod et al., 2016). No presente estudo demonstramos um aumento significativo da expressão gênica de *VEGFA* na lesão de pele de pacientes ENH comparados a pacientes LL. Esses achados, juntamente com nossos dados, sugerem a hipótese de que neutrófilos VEGFR1+ sejam recrutados do sangue pela liberação de VEGF-A no tecido e que estas células já estariam no tecido de pacientes ENH, contribuindo com patogênese da reação. Entretanto, para confirmação desta hipótese, são necessários mais trabalhos com maior tamanho amostral dos neutrófilos *ex vivo*, ensaios de quimiotaxia *in vitro* com neutrófilos purificados e o estudo da presença de neutrófilos VEGFR1+ na lesão de pele de pacientes ENH e da presença da proteína VEGF-A na lesão.

A inflamação gera um ambiente hipóxico devido ao aumento da demanda metabólica pelas células superando a disponibilidade de oxigênio, o que leva a ativação do HIF (Kempf et al., 2005). O HIF induz a transcrição do VEGF e é reconhecido como um evento chave na ativação de outros genes pró-angiogênicos, como PDGF-A, levando a indução da angiogênese (Cantatore et al., 2017; Tischer et al., 1991). Já foi descrito na literatura que a transmigração de neutrófilos pelo epitélio intestinal altera o perfil transcricional da mucosa pela depleção de O₂ do

microambiente, levando a ativação do fator de transcrição induzido por hipóxia (HIF), o que é fundamental para resolução da inflamação e que o infiltrado de neutrófilos é necessário para limitar a gravidade da doença (Campbell et al., 2014). Muitos autores sugerem o conceito de hipóxia inflamatória, no qual a inflamação e a hipóxia estão interligadas (Colgan; Taylor, 2010), porém, esse fenômeno ainda não foi descrito na hanseníase. Os nossos dados indicam que a lesão de pele de pacientes com ENH apresentam uma maior expressão do gene *HIF1A* comparado a pacientes LL. Em conjunto, esses dados sugerem que a expressão de *HIF1A* pode ter correlação com a expressão de *VEGF-A* observado nos pacientes com ENH.

Recentemente foi observado, *in vitro*, um aumento significativo da expressão gênica e liberação de enzimas MMP-8 e MMP-9 e de neutrófilos humanos estimulados com meio condicionado de monócitos infectados com *M. tuberculosis* em ambiente hipóxico, o que leva a destruição da matriz extracelular por estas células nestas condições. Além disso, foi observado que neutrófilos estimulados diretamente pelo *M. tuberculosis* em um ambiente hipóxico apresentaram inibição da formação de NET, apoptose e necrose. Esses achados indicam que o HIF atua como um importante regulador da resposta imune inata na tuberculose (Ong et al., 2018). Silva e colaboradores, demonstraram recentemente que tanto neutrófilos circulantes, como os presentes na lesão de pacientes ENH liberam armadilhas extracelulares (NETs) sugerindo que neutrófilos poderiam ser a fonte dos níveis elevados de DNA do hospedeiro observados em pacientes ENH (Silva et al., 2019).

A integrina beta 3 (integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ ou *ITGB3*) faz parte de uma família de integrinas expressas em células endoteliais durante a angiogênese patológica e inflamação, sendo mais estudada no angiogênese tumoral. Entretanto, não está claro se esta integrina apresenta um efeito positivo ou negativo na angiogênese patológica (Somanath et al., 2009). Já foi descrito que a inibição do *ITGB3* nas células endoteliais *in vitro* prejudica a angiogênese mediada por VEGF, pois esta inibição leva a regulação negativa da adesão e migração de células endoteliais. A estimulação de células endoteliais com VEGF leva a ativação de *ITGB3* que, por sua vez, induz a expressão de VEGFR2 nessas células. Neste mesmo trabalho também foi visto, *ex vivo*, que células endoteliais de tumores vascularizados expressam mais *ITGB3* do que em tecidos sadios (Mahabeleshwar et al., 2008).

Brilha e colaboradores demonstraram que monócitos estimulados com *M. tuberculosis*, *in vitro*, apresentaram uma regulação positiva da expressão de integrina $\alpha V\beta 3$ e que essa expressão levou ao aumento da adesão de monócitos ao colágeno tipo I, contribuindo a elevada secreção de MMP-1/10 por estas células. Também foi observado, *in vivo*, o aumento significativo da expressão gênica do *ITGB3* em amostras de escarro de pacientes com tuberculose quando comparados a amostras de indivíduos saudáveis. Este trabalho sugere que o aumento do recrutamento de monócitos e a atividade de colagenase induzida por *ITGB3* provoca danos aos tecidos durante a inflamação (Brilha et al., 2017). No estudo de Lee e colaboradores (2010), utilizando análises de bioinformática, foi observado uma expressão aumentada do gene *ITGB3* na lesão de pele de pacientes com ENH comparados a pacientes MB e essa expressão foi associada a neutrófilos e células endoteliais (Lee et al., 2010). Nossos resultados também demonstraram um aumento não significativo na expressão gênica do *ITGB3* em lesões de pacientes ENH quando comparados às lesões de pacientes LL, o que nos sugere a participação de moléculas angiogênicas em pacientes com ENH. Entretanto, esta integrina não é um bom marcador da via angiogênica.

O mecanismo de inibição da angiogênese em pacientes com ENH não tinha sido avaliado até o presente estudo. Este trabalho observou que pacientes com ENH que foram submetidos ao tratamento por 7 dias com talidomida, já possui uma redução significativa dos níveis de VEGF-A no soro comparados a pacientes no início do diagnóstico de ENH. O primeiro trabalho que relata o efeito anti-angiogênico da talidomida foi o estudo de D'Amato e colaboradores (1994), que verificou a inibição da formação de novos vasos sanguíneos na córnea de coelhos a partir da inibição do fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF), uma molécula estimuladora de angiogênese, resultada pela administração oral do medicamento (D'Amato et al., 1994; Carmeliet; Jain, 2011). A partir disso, outro estudo demonstrou que a talidomida é capaz de inibir a proliferação endotelial de células pela inibição de bFGF e VEGF-A. Além disso, o tratamento com fármaco reduziu a liberação de metaloproteinases de matriz 2 (MMP-2) e IL-8 pelas células endoteliais, sugerindo um caminho adicional para a sua atividade anti-angiogênica (Gelati et al., 2003). Komorowski e colaboradores analisaram o efeito da talidomida em uma linhagem de células endoteliais humanas *in vitro* e verificaram a inibição da secreção de VEGF-A e a migração celular, diminuição do número de capilares formados e o

aumento da adesão celular ao colágeno. Esses dados indicam que a talidomida é um potencial inibidor de VEGF-A, influenciando assim na formação de novos vasos (Komorowski et al., 2006).

Muitos estudos mostraram a inibição do VEGF-A como sendo o principal alvo do efeito anti-angiogênico da talidomida e essa propriedade é uma das hipóteses da sua teratogênese além de ser um mecanismo terapêutico para algumas doenças (Paravar; Lee, 2008; Millrine; Kishimoto, 2017). Apesar dos nossos dados da expressão gênica não mostrarem uma diferença significativa, os resultados encontrados confirmam a hipótese de que a talidomida é um bom inibidor da angiogênese tecidual em pacientes com ENH e que esta inibição pode estar ligada a diminuição do recrutamento de neutrófilos para o tecido, como já visto por Mendes e colaboradores (Mendes et al., 2017). Entretanto, acreditamos que o aumento do tamanho amostral nos permita avaliar se a talidomida induz uma redução significativa.

Em síntese, nosso estudo demonstrou que pacientes LL apresentam uma maior circulação de VEGF-A no soro, sugerindo que possa ser resultado da ação de macrófagos anti-inflamatórios predominantes nesses pacientes. Pela primeira vez, verificamos a circulação de neutrófilos com perfil angiogênico no sangue periférico de pacientes BT. Vimos um aumento significativo da expressão gênica de *VEGF-A* e *HIF-1A* na lesão de pele de pacientes com ENH, o que indica a acentuada atividade angiogênica nesses pacientes. Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que os genes *PDGF-A* e *ITGB3* não são bons marcadores angiogênicos para garantir a ação desse mecanismo na lesão de pele de pacientes com ENH, visto que esses genes estão presentes em diversos outros processos, como por exemplo, a fibrose tecidual. Por fim, nossos resultados corroboraram dados da literatura que sugerem a inibição de fatores angiogênicos pela talidomida, entretanto torna-se necessário a realização de mais testes para confirmar se essa inibição ocorre a nível molecular. Com isso, nosso trabalho contribuiu para entendermos um pouco mais sobre o processo de angiogênese no ENH e de que maneira, possivelmente, este processo está envolvido no seu desenvolvimento.

7. CONCLUSÃO:

Neste trabalho demonstramos que há circulação de VEGF-A no soro capaz de distinguir pacientes LL dos BT. E não houve diferença nos níveis séricos de VEGF-A e PDGF-BB em pacientes LL antes ou após o início da reação ENH, sugerindo que o mecanismo anti-inflamatório presente em pacientes LL podem estar influenciando nesses resultados.

Verificamos pela primeira vez a circulação de neutrófilos com perfil angiogênico em pacientes BT e ausência desses neutrófilos no sangue periférico de pacientes ENH. Na lesão de pele de pacientes ENH, foi encontrado uma significativa expressão gênica aumentada de *VEGF-A* e um aumento da expressão de HIF1A, comparada a pacientes LL. Esses dados em conjunto levam a hipótese de que os neutrófilos de pacientes ENH migraram para o tecido através do eixo de ligação VEGF-A/VEGFR1, entretanto é necessário um maior estudo para confirmar esta hipótese.

Além disso, observamos uma maior expressão de moléculas angiogênicas *PDGF-A* e *ITGB3* em pacientes LL comparados a pacientes ENH. Entretanto, não podemos sugerir o *ITGB3* e o *PDGF-A* como bons indicadores da atividade angiogênica, já que estão envolvidos em outros mecanismos patológicos.

Por fim, demonstramos a redução significativa dos níveis de VEGF-A no soro de pacientes ENH após 7 dias do tratamento com talidomida comparados a pacientes ENH sem tratamento, comprovando a ação anti-angiogênica deste medicamento após 7 dias de uso. No entanto, não foi possível analisar a inibição da angiogênese a nível molecular.

8. REFERÊNCIA:

- Agrawal S. The basic molecular biology of angiogenesis and its implication in anticancer therapeutics. *Arch Int Surg*. 2015;5(3):121.
- Andrade PR, Pinheiro RO, Sales AM, Illarramendi X, De Mattos Barbosa MG, Moraes MO, et al. Type 1 reaction in leprosy: A model for a better understanding of tissue immunity under an immunopathological condition. *Expert Rev Clin Immunol*. 2015;11(3):391–407.
- Anthony J, Vaidya MC, Dasgupta A. Immunoglobulin deposits in Erythema Nodosum Leprosum (ENL). *Hansen Int*. 1978;3(1):12–7.
- Antunes SL, Motta E, Almeida SM, Gallo ME, Nery JA, Lenzi HL. Distinct patterns of microvasculature in the cutaneous lesions of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 2000;68(2):143–51.
- Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am J Pathol*. 1990;137(4):749–53.
- Avanzi C, Benjak A, Stevenson K, Simpson VR, Busso P, Mcluckie J, et al. Infected With Leprosy Bacilli. *Science*. 2016;354(6313):744–8.
- Balogh E, Binięcka M, Fearon U, Veale DJ SZ. Angiogenesis in Inflammatory Arthritis. *Isr Med Assoc J*. 2019 May;5(21):345-352.
- Beiguelman B, Quagliato R. Sobre a Reação De Mitsuda *. *Rev Bras Leprol*. 1964;39–46.
- Benelli R, Lorusso G, Albini A, Noonan D. Cytokines and Chemokines as Regulators of Angiogenesis in Health and Disease. *Curr Pharm Des*. 2007;12(24):3101–15.
- Benjak A, Avanzi C, Singh P, Loiseau C, Girma S, Busso P, et al. Phylogenomics and antimicrobial resistance of the leprosy bacillus *Mycobacterium leprae*. *Nat Commun*. 2018;9(1).
- Bergers G, Song S. The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol*. 2005;7(4):452–64.
- Bhandarkar SS, Cohen C, Kuruvila M, Rea TH, MacKelfresh JB, Lee DJ, et al. Angiogenesis in cutaneous lesions of leprosy: Implications for treatment. *Arch Dermatol*. 2007;143(12):1527–9.
- Binford CH, Meyers WM, Walsh GP, Storrs EE, Brown HL. Naturally acquired leprosy like disease in the nine-banded armadillos *D. novemcinctus*, histopathologic and microbiologic studies of tissues. *J. Reticuloendothel Soc*. 1977;33:377–388.
- Brilha S, Wysoczanski R, Whittington AM, Friedland JS, Porter JC. Monocyte Adhesion, Migration, and Extracellular Matrix Breakdown Are Regulated by Integrin $\alpha V\beta 3$ in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J Immunol*. 2017;199(3):982–91.
- Calvo TL. Integração de Dados de Expressão Gênica em Larga Escala Na

- Hanseníase [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz; 2018.
- Campbell EL, Bruyninckx WJ, Kelly CJ, Glover LE, McNamee EN, Bowers BE, et al. Transmigrating neutrophils shape the mucosal microenvironment through localized oxygen depletion to influence resolution of inflammation. *Immunity*. 2014;40(1):66–77.
- Cantatore FP, Maruotti N, Corrado A, Ribatti D. Angiogenesis Dysregulation in Psoriatic Arthritis: Molecular Mechanisms. *Biomed Res Int*. 2017;2017:1–6.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*. 2003;9(6):653–60.
- Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, et al. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9-delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue Ghislain Opdenakker , Mia Phillipson Supplemental Data Figures S1-S4. *Blood*. 2012;120(23):4653–63.
- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature*. 2001;409(6823):1007–11.
- Colgan, Sean P. and Taylor CT. Hypoxia: an alarm signal during intestinal inflammation. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010;7(5):281–7.
- Cruz RCS, Bühner-Sékula S, Penna MLF, Penna GO TS. Leprosy: current situation, clinical and laboratory aspects, treatment history and perspective of the uniform multidrug therapy for all patients. *An Bras Dermatol*. 2017;92(6):761–73.
- Da Silva CO, Dias AA, da Costa Nery JA, de Miranda Machado A, Ferreira H, Rodrigues TF, et al. Neutrophil extracellular traps contribute to the pathogenesis of leprosy type 2 reactions. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(9):e0007368.
- De Athaide MM. Estudo da participação do PDGF nas células de Schwann humanas ST88-14 : possível envolvimento na fibrose neural na hanseníase [Dissertação]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz; 2018.
- De Sousa JR, Pagliari C, De Almeida DSM, Barros LFL, Carneiro FRO, Dias LB, et al. Th9 cytokines response and its possible implications in the immunopathogenesis of leprosy. *J Clin Pathol*. 2016;70(6):521–7.
- de Sousa JR, Sotto MN, Quaresma JAS. Leprosy as a complex infection: Breakdown of the Th1 and Th2 immune paradigm in the immunopathogenesis of the disease. *Front Immunol*. 2017;8(11):18–21.
- Dias, A. A., Silva, C. O., Santos, J. P. S., Batista-Silva, L. R., Acosta, C. C. D., Fontes, A. N. B., et al. DNA Sensing via TLR-9 Constitutes a Major Innate Immunity Pathway Activated during Erythema Nodosum Leprosum. *J Immunol*. 2016;197(11):4184–5.
- Eichelmann K, González SEG. Leprosy . An Update : Definition , Pathogenesis , Classification, Diagnosis, and Treatment. *Actas Dermosifiliogr*. 2013;104(7):554–63.
- Elghetany MT. Surface antigen changes during normal neutrophilic development: A critical review. *Blood Cells, Mol Dis*. 2002;28(2):260–74.

- Elpek GÖ. Angiogenesis and liver fibrosis. *World J Hepatol.* 2015;7(3):377–91.
- Eltzschig HK, Carmeliet P. Hypoxia and Inflammation. *N Engl J Med.* 2011;364(7):656–65.
- Fairweather D, Cihakova D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J Autoimmun.* 2009;33(3–4):222–30.
- Fiallo P, Clapasson A, Favre A, Pesce C. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its endothelial cell receptor KDR in Type 1 leprosy reaction. *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(2):180–5.
- Fischer M. Leprosy - an overview of clinical features, diagnosis, and treatment. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2017;15(8):801–27.
- Fleury RN. Critérios para o emprego de classificação de Ridley e Jopling na rotina dos laboratórios de anatomia patológica. *Hansen Int.* 2006;31:47–51.
- Fonseca AB de L, Simon M do V, Cazzaniga RA, de Moura TR, de Almeida RP, Duthie MS, et al. The influence of innate and adaptative immune responses on the differential clinical outcomes of leprosy. *Infect Dis Poverty.* 2017;6(1):5
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD SG. Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 1996;16(9):4604–13.
- Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 2003;161(6):1163–77.
- Haslett PAJ, Roche P, Butlin CR, Macdonald M, Shrestha N, Manandhar R, et al. Effective Treatment of Erythema Nodosum Leprosum with Thalidomide Is Associated with Immune Stimulation. *J Infect Dis.* 2005;192(12):2045–53.
- Hastings RC, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Franzblau SG. Leprosy. *Clin Microbiol Rev.* 1988;1(3):330–48.
- Heikal L, Ferns G. Hypoxia, Angiogenesis and Atherogenesis. *Physiol Pathol Angiogenes - Signal Mech Target Ther.* 2017;7:113–31.
- Heikal L, Ghezzi P, Mengozzi M, Ferns G. Assessment of HIF-1 α expression and release following endothelial injury in-vitro and in-vivo. *Mol Med.* 2018;24(1):1–10.
- Heldin CH, Eriksson U, Östman A. New members of the platelet-derived growth factor family of mitogens. *Arch Biochem Biophys.* 2002;398(2):284–90.
- Hellström M, Gerhardt H, Kalén M, Li X, Eriksson U, Wolburg H, et al. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J Cell Biol.* 2001;152(3):543–53.
- Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR- β in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development.* 1999;126(14):3047–55.

- Hirata T. Electron microscopic observations of cell wall and cytoplasmic membrane in murine and human leprosy bacilli. *Int J Lepr.* 1985;53(3):433–40.
- Honap TP, Pfister LA, Housman G, Mills S, Tarara RP, Suzuki K, et al. *Mycobacterium leprae* genomes from naturally infected nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12(1):1–17.
- Hunter SW, Brennan PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol.* 1981;147(3):728–35.
- Husain N, Awasthi S, Haris M, Gupta RK, Husain M. Vascular endothelial growth factor as a marker of disease activity in neurotuberculosis. *Br Infect Soc.* 2008;56:114–9.
- Jaillon S, Peri G, Delneste Y, Frémaux I, Doni A, Moalli F, et al. The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps. *J Exp Med.* 2007;204(4):793–804.
- Jakobsson L, Franco CA, Bentley K, Collins RT, Ponsioen B, Aspalter IM, et al. Endothelial cells dynamically compete for the tip cell position during angiogenic sprouting. *Nat Cell Biol.* 2010;12(10):943–53.
- Janela B, Patel AA, Lau MC, Goh CC, Msallam R, Kong WT, et al. A Subset of Type I Conventional Dendritic Cells Controls Cutaneous Bacterial Infections through VEGF α -Mediated Recruitment of Neutrophils. *Immunity.* 2019;50(4):1069-1083.e8.
- Ka MB, Dumas A, Textoris J, Mege JL. Phenotypic diversity and emerging new tools to study macrophage activation in bacterial infectious diseases. *Front Immunol.* 2014;5(10):1–7.
- Kahawita IP, Lockwood DNJ. Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(4):329–37.
- Kamath S, Vaccaro SA, Rea TH, Ochoa MT. Recognizing and managing the immunologic reactions in leprosy. *J Am Acad Dermatol.* 2014;71(4):795–803.
- Kang TY, Bocci F, Jolly MK, Levine H, Onuchic JN, Levchenko A. Pericytes enable effective angiogenesis in the presence of proinflammatory signals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(47):23551–61.
- Kempf VAJ, Lebedziejewski M, Alitalo K, Wälzlein J-H, Eehalt U, Fiebig J, et al. Activation of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Bacillary Angiomatosis. *Circulation.* 2005;111(8):1054–62.
- Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo. (*Dasyus novemcinctus*) as a model for the study of leprosy. *Int J Lepr* 1971;39:692-701
- Klatser PR, Van Beers S, Madjid B, Day R, De Wit MYL. Detection of *Mycobacterium leprae* nasal carriers in populations for which leprosy is endemic. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):2947–51.
- Klinkhammer BM, Floege J, Boor P. PDGF in organ fibrosis. *Mol Aspects Med.* 2018;62:44–62.

- Knod JL, Crawford K, Dusing M, Collins MH, Chernoguz A, Frischer JS. Angiogenesis and Vascular Endothelial Growth Factor-A Expression Associated with Inflammation in Pediatric Crohn's Disease. *J Gastrointest Surg.* 2016;20(3):624–30.
- Lampugnani MG. Endothelial adherens junctions and the actin cytoskeleton: an "infinity net"? *J Biol.* 2010;9(3):16.
- Larsson A, Sköldenberg E, Ericson H. Serum and plasma levels of FGF-2 and VEGF in healthy blood donors. *Angiogenesis.* 2002;5(1–2):107–10.
- Lastória JC, de Abreu MAMM. Hanseníase: diagnóstico e tratamento. *Diagn Trat.* 2012;17(4):173–9.
- Lastória JC, de Abreu MAMM. Leprosy: Review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol.* 2014;89(2):205–18.
- Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, et al. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis.* 2010;201(4):558–69.
- Liu J, Wang X, Yang X, Yan Q, Wang S, Han W. Investigating the role of angiogenesis in systemic lupus erythematosus. *J Sage Publ.* 2015;24(6):621–7.
- Lockwood DNJ, Sarno E, Smith WC. Classifying leprosy patients - Searching for the perfect solution? *Lepr Rev.* 2007;78(4):317–20.
- Lockwood DNJ, Suneetha L, De Sagili K, van Chaduvula M, Mohammed I, van Brakel W, et al. Cytokine and protein markers of leprosy reactions in skin and nerves: Baseline results for the north indian infir cohort. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(12).
- Logsdon EA, Finley SD, Popel AS, MacGabhann F. A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J Cell Mol Med.* 2014;18(8):1491–508.
- Mabalay MC, Helwig EB, Tolentino JG, Binford CH. The histopathology and histochemistry of erythema nodosum leprosum. *Int J Lepr.* 1965;33:28–49.
- Mahabeleshwar GH, Chen J, Feng W, Somanath PR, Razorenova O V., Byzova T V. Integrin affinity modulation in angiogenesis. *Cell Cycle.* 2008;7(3):335–47.
- Marsboom G, Rehman J. Hypoxia Signaling in Vascular Homeostasis. *Physiology.* 2018;33(5):328–37.
- Martinez AN, Talhari C, Moraes MO, Talhari S. PCR-Based Techniques for Leprosy Diagnosis: From the Laboratory to the Clinic. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8(4):1–8.
- Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.* 2014;6(3):13.
- Massena S, Christoffersson G, Vågesjö E, Seignez C, Gustafsson K, Binet F, et al. Identification and characterization of VEGF-A-responsive neutrophils expressing CD49d, VEGFR1, and CXCR4 in mice and humans. *Blood.* 2015;126(17):2016–26.
- Massone C, Belachew WA, Schettini A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. *Clin Dermatol.* 2015;33(1):38–45.

Mendes MA, de Carvalho DS, Amadeu TP, Silva BJ de A, Prata RB da S, da Silva CO, et al. Elevated Pentraxin-3 Concentrations in Patients With Leprosy: Potential Biomarker of Erythema Nodosum Leprosum. *J Infect Dis*. 2017;216(12):1635–43.

Millrine D, Kishimoto T. A Brighter Side to Thalidomide: Its Potential Use in Immunological Disorders. *Trends Mol Med*. 2017;23(4):348–6.

Ministério da Saúde. Diretrizes para vigilância, atenção e controle da hanseníase. PORTARIA 3125. 2010;

Ministério da Saúde. Guia De Vig Em Saúde [Internet]. 2019. 1–740 p. Acessado em 10/11/2019. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_volume_unico_3ed.pdf

Ministério da Saúde. Manual De Leprologia. Serviço Nac Lepra [Internet]. 1960; Acessado em 10/11/2019. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_leprologia.pdf

Miranda A, Amadeu TP, Schueler G, Alvarenga FBF, Duppré N, Ferreira H, et al. Increased Langerhans cell accumulation after mycobacterial stimuli. *Histopathology*. 2007;51(5):649–56.

Miranda AM, Antunes SLG, Nery JAC, Sales AM, Pereira MJ dos S, Sarno EN. Erythema multiforme in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:34–42.

Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol*. 1983;8(2):182–9.

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

Moet FJ, Pahan D, Schuring RP, Oskam L, Richardus JH. Physical Distance, Genetic Relationship, Age, and Leprosy Classification Are Independent Risk Factors for Leprosy in Contacts of Patients with Leprosy. *J Infect Dis*. 2006;193(3):346–53.

Monot M., Honoré N., Garnier T., Araoz R., Coppée J-Y., Lacroix C. et al. On the origin of Leprosy. *Science*. 2005;308(5724):1040–2.

Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Article Divergence of Macrophage Phagocytic and Antimicrobial Programs in Leprosy. *Cell Host Microbe*. 2009;6(4):343–53.

Montoya D, Modlin RL. Learning from Leprosy. Insight into the human innate immune response. *Adv Immunol*. 2010;105:1-24.

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

Moreira AL, Sampaio EP, Zmuidzinis A, Frindt P, Smith KA, Kaplan G. Thalidomide Exerts Its Inhibitory Action on Tumor Necrosis Factor α by Enhancing mRNA Degradation. 1993;177(6):6–11.

- Moubasher AEDA, Kamel NA, Zedan H, Raheem DEDA. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol*. 1998;37(10):733–40.
- Murphy GF, Sanchez NP, Flynn TC, Sanchez JL, Mihm MC, Soter NA. Erythema nodosum leprosum: Nature and extent of the cutaneous microvascular alterations. *J Am Acad Dermatol*. 1986;14(1):59–69.
- Naafs B, Noto S. Reactions in Leprosy. 2012. In: Nunzi E, Massone C (eds) *Leprosy*. Springer, Milano
- Naafs B, van Hees CLM. Leprosy type 1 reaction (formerly reversal reaction). *Clin Dermatol*. 2016;34(1):37–50.
- Naegelen I, Beaume N, Plançon S, Schenten V, Tschirhart EJ, Brécharde S. Regulation of Neutrophil Degranulation and Cytokine Secretion: A Novel Model Approach Based on Linear Fitting. *J Immunol Res*. 2015;2015.
- Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of leprosy and diagnostic challenges. *Clin Dermatol*. 2015;33(1):90–8.
- Negera E, Walker SL, Lema T, Aseffa A, Lockwood DN, Dockrell HM. Complement C1q expression in Erythema nodosum leprosum. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(3):1–11.
- Nery JA da C, Bernardes Filho F, Quintanilha J, Machado AM, Oliveira S de SC, Sales AM. Understanding the type 1 reactional state for early diagnosis and treatment: a way to avoid disability in leprosy. *An Bras Dermatol*. 2013;88(5):787–92.
- Nery JA da C, Sales AM, Illarramendi X, Duppre NC, Jardim MR, Machado AM. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais. Uma abordagem prática. *An Bras Dermatol*. 2006;81(4):367–75.
- Nery JAC, Sales AM, Illarramendi X, Duppre NC, Jardim MR, Machado AM. Contribution to diagnosis and management of reactional states: A practical approach. *An Bras Dermatol*. 2006;81(4):367–75.
- Nery JAC, Vieira LMM, De Matos HJ, Gallo MEN, Sarno EN. Reactional states in multibacillary hansen disease patients during multidrug therapy. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1998;40(6):363-70.
- Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, et al. Role of the Cell Wall Phenolic Glycolipid-1 in the Peripheral Nerve Predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell*. 2000;103(3):511–24.
- Nishigaki Y, Fujiuchi S, Fujita Y, Yamazaki Y, Sato M, Yamamoto Y, et al. Increased serum level of vascular endothelial growth factor in *Mycobacterium avium* complex infection. *Respirology*. 2006;11(4):407–13.
- Nofal A, Al-Makhzangy I, Attwa E, Nassar A, Abdalmoati A. Vascular endothelial growth factor in psoriasis: An indicator of disease severity and control. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2009;23(7):803–6.
- Nogueira MRS, Latini ACP, Nogueira MES. The involvement of endothelial mediators in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016;111(10):635–41.

Noriega LF, Di Chiacchio N, Noriega AF, Pereira GAAM, Vieira ML. Leprosy: Ancient disease remains a public health problem nowadays. *An Bras Dermatol*. 2016;91(4):547–8.

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

Ong CWM, Fox K, Ettore A, Elkington PT, Friedland JS. Hypoxia increases neutrophil-driven matrix destruction after exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–11.

Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. Global leprosy update, 2018: moving towards a leprosy free world. *Wkly Epidemiol Rec [Internet]*. 2019;35/36(94):389–412. Acesso em: 02/11/2019. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/326775/WER9435-36-en-fr.pdf>

Organização Mundial de Saúde. World Health Organization. WHO Expert Committee on Leprosy Seventh Report. 1998.

Pacheco FS, Prata RBS, Brandão SS, Ferreira H, Rodrigues TF, Santos JB, et al. Erythema Nodosum Leprosum Neutrophil Subset Expressing IL-10R1 Transmigrates into Skin Lesions and Responds to IL-10. *ImmunoHorizons*. no prelo 2020.

Pandhi D, Chhabra N. New insights in the pathogenesis of type 1 and type 2 lepra reaction. *Indian J Dermatology, Venereol Leprol*. 2013;79(6):739.

Patrocínio LG, Goulart IMB, Goulart LR, Patrocínio JA, Ferreira FR, Fleury RN. Detection of *Mycobacterium leprae* in nasal mucosa biopsies by the polymerase chain reaction. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2005;44(3):311–6.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):e45.

Pinheiro RO, Schmitz V, de Andrade Silva BJ, Dias AA, de Souza BJ, de Mattos Barbosa MG, et al. Innate immune responses in leprosy. *Front Immunol*. 2018;9(3):1–15.

Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;74(5):868–79.

Polena H, Boudou F, Tilleul S, Dubois-Colas N, Lecointe C, Rakotosamimanana N, et al. *Mycobacterium tuberculosis* exploits the formation of new blood vessels for its dissemination. *Sci Rep*. 2016;6(8):1–11.

Polycarpou A, Walker SL, Lockwood DNJ. A Systematic Review of Immunological Studies of Erythema Nodosum Leprosum. *Front Immunol*. 2017;8(3).

Potente M, Carmeliet P. The Link Between Angiogenesis and Endothelial Metabolism. *Annu Rev Physiol*. 2017;79(1):43–66.

Primo L, Seano G, Roca C, Maione F, Gagliardi PA, Sessa R, et al. Increased expression of $\alpha 6$ integrin in endothelial cells unveils a proangiogenic role for

basement membrane. *Cancer Res.* 2010;70(14):5759–69.

Ramakers C, Ruijter JM, Lekanne Deprez RH, Moorman AFM. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett.* 2003;339(1):62–6.

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

Ridley DS & JW. Classification of Leprosy According to Immunity A Five-group System. *Int J Lepr.* 1966;34(3):1215.

Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel S, Nizet V, et al. NF- κ B links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1 α . *Nature.* 2008;453(7196):807–11.

Rojas, R. E., Demichelis, S. O., Sarno, E. N., & Segal-Eiras A. IgM anti-phenolic glycolipid I and IgG anti-10-kDa heat shock protein antibodies in sera and immune complexes isolated from leprosy patients with or without erythema nodosum leprosum and contacts. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1997;19(1):65–74.

Sadhu S, Mitra DK. Emerging concepts of adaptive immunity in leprosy. *Front Immunol.* 2018;9(4):1–7.

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

Sales AM, Ponce de Leon A, Düppre NC, Hacker MA, Nery JAC, Sarno EN, et al. Leprosy among patient contacts: A multilevel study of risk factors. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(3):1–6.

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

Santos D, Miranda A, Suffys P, Rodrigues C, Bourguignon S, Castro H. Current Understanding of the Role of Dendritic Cells and Their Co-Stimulatory Molecules in Generating Efficient T Cell Responses in Lepromatous Leprosy. *Curr Immunol Rev.* 2007;3(1):77–85.

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

Sarno EN, Sampaio EP, Kaplan G, Miranda A, Nery JAC, Miguel CP, et al. The Influence of Thalidomide on the Clinical and Immunologic Manifestation of Erythema Nodosum Leprosum. *J Infect Dis.* 1993;168(2):408–14.

Schlesinger LS, Horwitz MA. Phagocytosis of *Mycobacterium leprae* by human monocyte-derived macrophages is mediated by complement receptors CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18), and CR4 (CD11c/CD18) and IFN-gamma activation inhibits complement receptor function and phagocytosis of this bacterium. *J Immunol.* 1991;147:1983–1994.

- 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. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8):1–18.
- Schmitz V, Tavares IF, Pignataro P, Machado A de M, Pacheco FDS, Dos Santos JB, et al. Neutrophils in Leprosy. *Front Immunol*. 2019;10(March):495.
- Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(2):338–81.
- Scollard DM, Truman RW, Ebenezer GJ. Mechanisms of nerve injury in leprosy. *Clin Dermatol*. 2015;33(1):46–54.
- Semenza G. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine. *Cell*. 2012;148(3):399–408.
- Semenza GL. Regulation of hypoxia-induced angiogenesis: A chaperone escorts VEGF to the dance. *J Clin Invest*. 2001;108(1):39–40.
- Sengupta U. Recent Laboratory Advances in Diagnostics and Monitoring Response to Treatment in Leprosy. *Indian Dermatol Online J*. 2018;10(4):481–5.
- Sheskin J. Thalidomide in the treatment of lepra reactions. *Clin Pharmacol Ther*. 1965;6(3):303–6.
- Shibuya M. Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J Biochem*. 2013;153(1):13–9.
- Shikada Y, Yonemitsu Y, Koga T, Onimaru M, Nakano T, Okano S, et al. Platelet-derived growth factor-AA is an essential and autocrine regulator of vascular endothelial growth factor expression in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Res*. 2005;65(16):7241–8.
- Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(21):4111–26.
- Soares CT, Rosa PS, Trombone APF, Fachin LRV, Ghidella CC, Ura S, et al. Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Spectrum of Leprosy and Its Reactional Forms. *PLoS One*. 2013;8(9):1–10.
- Somanath PR, Malinin NL BT. Cooperation between integrin $\alpha\beta 3$ and VEGFR2 in angiogenesis. *Angiogenesis*. 2009;12(2):177–85.
- Souza CS. Hanseníase : Formas Clínicas E Diagnóstico. *Rev Med Ribeirão Preto*. 1997;325–34.
- Spencer JS, Brennan PJ. The role of *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid I (PGL-I) in serodiagnosis and in the pathogenesis of leprosy. *Lepr Rev*. 2011;82(4):344–57.
- Stefani MM de A, Grassi AB, Sampaio LH, de Sousa ALOM, Costa MB, Scheelbeek P, et al. Comparison of two rapid tests for anti-phenolic glycolipid-i serology in Brazil

and Nepal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:124–31.

Stefani MM, Guerra JG, Sousa ALM, Costa MB, Oliveira MLW, Martelli CT, et al. Potential plasma markers of type 1 and type 2 leprosy reactions: A preliminary report. *BMC Infect Dis*. 2009;9(75):6–13.

Suto K, Yamazaki Y, Morita T, Mizuno H. Crystal structures of novel Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) from snake venoms: Insight into selective VEGF binding to kinase insert domain-containing receptor but not to fms-like tyrosine kinase-1. *J Biol Chem*. 2005;280(3):2126–31.

Szade A, Grochot-Przeczek A, Florczyk U, Jozkowicz A, Dulak J. Cellular and molecular mechanisms of inflammation-induced angiogenesis. *IUBMB Life*. 2015;67(3):145–59.

Szekanecz Z, Koch AE. Vascular involvement in rheumatic diseases: “Vascular rheumatology.” *Arthritis Res Ther*. 2008;10(5).

Teo SK, Resztak KE, Scheffler MA, Kook KA, Zeldis JB, Stirling DI, et al. Thalidomide in the treatment of leprosy. *Microbes Infect*. 2002;4(11):1193–202.

Teo SK, Stirling DI, Zeldis JB. Thalidomide as a novel therapeutic agent: New uses for an old product. *Drug Discov Today*. 2005;10(2):107–14.

Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem*. 1991;266(18):11947–54.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, et al. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. *N Engl J Med*. 2011;364(17):1626–33.

Tsutsumi N, Yonemitsu Y, Shikada Y, Onimaru M, Tanii M, Okano S, et al. Essential role of PDGFR α -p70S6K signaling in mesenchymal cells during therapeutic and tumor angiogenesis in vivo role of PDGFR α during angiogenesis. *Circ Res*. 2004;94(9):1186–94.

Tuleta I, Biener L, Pizarro C, Nickenig G, Skowasch D. Proangiogenic and Profibrotic Markers in Pulmonary Sarcoidosis. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1114:57–66.

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

Van Der Flier M, Van Leeuwen HJ, Van Kessel KP, Kimpen JL, Hoepelman AI, Geelen SP. Plasma vascular endothelial growth factor in severe sepsis. *Shock*. 2005;23(1):35–8.

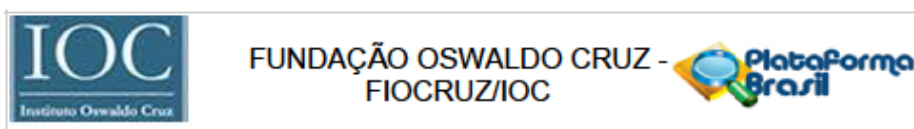
Vargesson N. Thalidomide-induced teratogenesis: History and mechanisms. *Birth Defects Res Part C - Embryo Today Rev*. 2015;105(2):140–56.

Walker S et al. The development of a severity scale for Erythema Nodosum

- Leprosium – the ENLIST ENL severity scale. *Br J Dermatol.* 2016;175(July):203–4.
- Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy type 1 (reversal) reactions and their management. *Lepr Rev.* 2008;79(4):372–86.
- Walmsley SR, Print C, Farahi N, Peyssonnaud C, Johnson RS, Cramer T, et al. Hypoxia-induced neutrophil survival is mediated by HIF-1 α -dependent NF- κ B activity. *J Exp Med.* 2005;201(1):105–15.
- Wemambu SNC, Turku JL. Erythema Nodosum Leprosum: a Clinical Manifestation of the Arthus Phenomenon. *Lancet.* 1969;933–5.
- White C, Franco-Paredes C. Leprosy in the 21st century. *Clin Microbiol Rev.* 2015;28(1):80–94.
- Yamamura M, Wang XH, Ohmen JD, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J. Immunol.* 1992;149(4):1470–5.
- Ziakas PD, Prodromou ML, El Khoury J, Zintzaras E, Mylonakis E. The role of TLR4 896 A>G and 1196 C>T in susceptibility to infections: A review and meta-analysis of genetic association studies. *PLoS One.* 2013;8(11):1–13.
- Ziora D, Jastrzębski D, Adamek M, Czuba Z, J JK, Grzanka A, et al. Circulating concentration of markers of angiogenic activity in patients with sarcoidosis and idiopathic pulmonary fibrosis. *BMC Pulm Med.* 2015;15(1):113.

Anexo A

Aprovação do comitê de ética e pesquisa do Instituto Oswaldo Cruz CEP IOC/Fiocruz (CAAE 56113716.5.0000.5248).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Papel de neutrófilos na imunopatogênese da hanseníase

Pesquisador: Verônica Schmitz Pereira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 56113716.5.0000.5248

Instituição Proponente: Instituto Oswaldo Cruz-RJ

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.645.636

Apresentação do Projeto:

O Eritema Nodoso Hansênico (ENH) é uma complicação imunológica grave da hanseníase que pode aparecer antes, durante ou depois da poliquimioterapia. O ENH é considerado uma importante causa de morbidade entre os pacientes multibacilares, pois pode levar ao dano no nervo, paralisia e deformidades sem um acompanhamento médico. O ENH caracteriza-se pelo aparecimento súbito de nódulos inflamatórios, eritematosos, localizados na pele aparentemente normal e, ou tecido subcutâneo e o envolvimento de vários órgãos, frequentemente associada com manifestações sistêmicas. Não existe biomarcadores atuais validados disponíveis para detectar o ENH. A busca de biomarcadores facilitará abordagens diagnósticas rápidas, além de contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos moleculares. Dentro desse contexto, os neutrófilos podem funcionar como sensores biológicos devido às diversas mudanças que ocorrem na expressão de moléculas de superfície acompanhadas de alterações no microambiente. Logo, um teste rápido no sangue capaz de detectar essas variações é muito valioso para prever o ENH.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Caracterizar a presença de subpopulações de neutrófilos com perfil e plasticidade diferentes na Hanseníase.

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)
Bairro: Mangulhos CEP: 21.040-360
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3882-9011 Fax: (21)2561-4815 E-mail: cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

Anexo B

Formulário oficial do ENLIST empregado na escala de gravidade por (Walker et al., 2016).

ENLIST EESS

SI Appendix

ENLIST ENL Severity Scale – FINAL VERSION, which supersedes the previously published version[24]

Pain Rating - Visual Analogue Scale (Ensure line is 100 mm long)

How severe is your pain today? Mark the line below with an X to indicate how bad you feel your pain is *today*

No Pain

Worst possible
Pain

ITEM	SCORES				SCORE	
	0	1	2	3		
1	VAS – Pain (mm)	0	1-39	40-69	70-100	
2	Fever (in °C)	None (37.5 or less)	No fever now but history of fever in last 7 days	37.6-38.5	38.6 or higher	
3	Number of ENL skin lesions	None	1-10	11-20	21 or more	
4	Inflammation of ENL skin lesions	Non tender	Redness	Painful	Complex	
5	Extent of ENL skin lesions	0	1-2 regions	3-4 regions	5-7 regions	
6	Peripheral oedema	None	1 site of Hands or Feet or Face	2 sites	All three sites (Hands and Feet and Face)	
7	Bone pain	None	Present on examination but does not limit activity	Sleep or activity disturbed	Incapacitating	
8	Inflammation of Joints and/or digits due to ENL	None	Present on examination but does not limit activity	Sleep or activity disturbed	Incapacitating	
9	Lymphadenopathy due to ENL	None	Enlarged	Pain or tenderness in 1 group	Pain or tenderness in 2 or more groups	
10	Nerve tenderness due to ENL	None	Absent if attention distracted	Present even if attention distracted	Patient withdraws limb on examination	
TOTAL						