

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ANA LUISA GOMES MENDES

ASSOCIAÇÃO DE BIOMARCADORES DO INFLAMASSOMA ÀS DIFERENTES
FORMAS IMUNOPATOLÓGICAS DA HANSENÍASE

Belo Horizonte

2017

ANA LUISA GOMES MENDES

ASSOCIAÇÃO DE BIOMARCADORES DO INFLAMASSOMA ÀS DIFERENTES
FORMAS IMUNOPATOLÓGICAS DA HANSENÍASE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier.

Belo Horizonte

2017

Mendes, Ana Luisa Gomes.
M538a Associação de biomarcadores do inflamassoma às diferentes formas imunopatológicas da hanseníase [manuscrito]. / Ana Luisa Gomes Mendes. -- Belo Horizonte: 2017. 114f.
Orientador: Marcelo Antônio Pascoal Xavier.
Área de concentração: Patologia.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Hanseníase. 2. Inflamassomos. 3. Caspases. 4. Proteína 3 que Contém Domínio de Pirina da Família NLR. 5. Imuno-Histoquímica. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Xavier, Marcelo Antônio Pascoal. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WC 335

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE: PATOLOGIA

Reitor: **Jaime Arturo Ramírez**

Vice-Reitora: **Sandra Regina Goulart Almeida**

Pró-Reitora de Pós-Graduação: **Denise Maria Trombert de Oliveira**

Pró-Reitor de Pesquisa: **Ado Jório**

Diretor da Faculdade de Medicina: **Tarcizo Afonso Nunes**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Humberto José Alves**

Coordenador Geral do Centro de Pós-Graduação: **Luis Armando Cunha de Marco**

Subcoordenador Geral do Centro de Pós-Graduação: **Edson Samesima Tatsuo**

Chefe do Departamento de Patologia: **Cristiana Buzelin Nunes**

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Patologia: **Wagner Luiz Tafuri**

Vivendo se aprende; mas o que se aprende,
mais, é só a fazer outras maiores perguntas.

João Guimarães Rosa.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida e por toda a força e inspiração. Aos meus queridos pais, pela confiança e estímulo constantes, e principalmente pelo exemplo de dignidade, honestidade e amor. Ao meu esposo amado, por todo o apoio e cumplicidade.

Ao Prof. Marcelo Antônio Pascoal Xavier, por ter acreditado em mim e ter-me concedido o convívio, o aprendizado e a orientação de forma sempre competente, atenciosa e gentil, e também pela amizade construída e consolidada.

À Fernanda, pelo suporte, disponibilidade, generosidade e paciência na realização das etapas da pesquisa.

Aos alunos da Iniciação Científica, Heloísa, Mara e Ramon, na coleta, organização e tabulação dos dados utilizados na pesquisa.

Ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela cooperação e estímulo à pesquisa em patologia.

À Secretaria do Departamento de Anatomia Patológica, através de Célia e Nayara, pelo suporte durante o percurso.

Aos colegas, professores e amigos patologistas e residentes da Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, pela convivência, pela partilha de experiências, conhecimento e pelas boas lembranças.

Ao laboratório de Dermatopatologia do Anexo de Dermatologia Osvaldo Costa, do Hospital das Clínicas da UFMG, pela disponibilização do material histológico base para o estudo em questão e pelas colaborações técnico-científicas.

Enfim, agradeço a todos que fizeram parte desta etapa importante em minha vida.

RESUMO

A hanseníase ainda permanece como grave problema de saúde pública no Brasil. Essa doença negligenciada possui ampla variedade de manifestações clínicas e histopatológicas que estão relacionadas com as respostas inflamatória e imune do hospedeiro. Mais recentemente, o inflamassoma, um complexo conjunto de proteínas, assumiu papel relevante na resposta inflamatória contra agentes microbiológicos. Entretanto, é pouco conhecida a participação do inflamassoma na hanseníase. Assim, realizamos um estudo observacional, transversal e comparativo da expressão imunofenotípica de proteínas associadas ao inflamassoma em diferentes formas imunopatológicas da hanseníase por imuno-histoquímica. Foram avaliadas a intensidade e o percentual da imunorreatividade de NLRP3, caspases 1 e 4/5 e interleucinas (IL) 1 β , 6 e 18 nos compartimentos epiderme, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras de pele. Foram observadas fortes expressões de NLRP3 e das caspases inflamatórias 4/5, em todos os compartimentos das amostras do polo virchowiano, e da IL6, no endotélio das amostras do polo tuberculóide, além da pouca ou fraca expressão da caspase-1, IL1 β e IL18 nessas formas polares da doença. A forma interpolar ou *borderline* apresentou imunofenótipo predominantemente similar ao polo virchowiano. Esses resultados demonstram, apesar da forte ativação das vias clássica e não-canônica do inflamassoma NLRP3 nas formas multibacilares, a inativação do inflamassoma NLRP3 na hanseníase, sugerindo evasão imune do *M. leprae*, o que poderá ser usado no diagnóstico ou tratamento da hanseníase.

Palavras-chave: Hanseníase; Inflamassoma; NLRP3; Caspase.

ABSTRACT

Leprosy still remains a serious public health problem in Brazil. This neglected disease has a wide range of clinical and histopathological manifestations which are related to the host inflammatory and immune responses. More recently, inflammasome, a complex set of proteins, has assumed a relevant role in the inflammatory response against microbiological agents. However, the involvement of inflammasome in leprosy is poorly understood. Thus, we performed an observational, cross-sectional and comparative study of the immunophenotypic expression of inflammasome-associated proteins in different immunopathological forms of leprosy by immunohistochemistry. The intensity and percentage of NLRP3, caspase-1 and 4/5 and interleukin (IL) 1 β , 6 and 18 immunoreactivity in the epidermal, inflammatory infiltrate and endothelial compartments of skin biopsies were evaluated. Strong expressions of NLRP3 and inflammatory caspases 4/5 were observed in all compartments of the virchowian pole and IL6 in the endothelium of the tuberculoid pole, in addition to the low expression of caspase-1, IL1 β and IL18 in these polar forms. The interpolar or borderline form showed immunophenotype predominantly similar to the Virchowian pole. Despite of the strong activation of NLRP3 inflammasome classic and noncanonical pathways in the multibacillary forms, these results demonstrate the inactivation of NLRP3 inflammasome in the leprosy, suggesting immune evasion of *M. leprae*, which can be used in the diagnosis or treatment of Leprosy.

Keywords: Leprosy; Inflammasome; NLRP3; Caspase.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Novos casos de hanseníase, por 100.000 hab., no mundo, em 2014.....	19
FIGURA 2 – Coeficiente geral de detecção de hanseníase por 100 mil habitantes, segundo regiões geográficas e Unidades da Federação. Brasil, 2014.....	20
FIGURA 3 – Padrões de resposta imune na Hanseníase.....	27
FIGURA 4 – O inflamassoma: ativação e estrutura.....	29
FIGURA 5 – Parâmetros para análise qualitativa da reatividade imuno-histoquímica.....	39
FIGURA 6 – Parâmetros da análise semi-quantitativa da imuno-histoquímica.....	39
FIGURA 7 – Grupos comparativos do estudo.....	41
FIGURA 8 - Imunorreatividade de NLRP3 nos grupos D, MHB, MHT e MHV.....	44
FIGURA 9 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador NLRP3.....	47
FIGURA 10 - Imunorreatividade de Caspase 1 nos grupos D, MHB, MHT e MHV.....	48
FIGURA 11 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador Caspase-1.....	51
FIGURA 12 - Imunorreatividade de Caspases 4/5 nos grupos D, MHB, MHT e MHV.....	52
FIGURA 13 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador Caspases 4/5.....	55
FIGURA 14 - Imunorreatividade de IL1 β nos grupos D, MHB, MHT e MHV.....	56
FIGURA 15 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL1 β	58
FIGURA 16 - Imunorreatividade de IL6 nos grupos D, MHB, MHT e MHV.....	59
FIGURA 17 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL6.....	62
FIGURA 18 - Imunorreatividade de IL18 nos grupos D, MHB, MHT e MHV.....	63
FIGURA 19 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL18.....	65
FIGURA 20 – Gráficos de barras da expressão forte (Escore 1) dos biomarcadores NLRP3, caspases 1 e 4/5 e interleucinas 1 β , 6 e 18.....	72
FIGURA 21 – Mecanismos de interação do inflamassoma NLRP3 com o <i>M. leprae</i>	79

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Intensidade e percentual da imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, Caspases 1 e 4/5 e Interleucinas 1 β , 6 e 18 nas amostras do controle externo.....	43
TABELA 2 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador NLRP3	45
TABELA 3 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador Caspase-1	49
TABELA 4 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador Caspases 4/5	53
TABELA 5 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL1 β	57
TABELA 6 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL-6	60
TABELA 7 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL18	64
TABELA 8 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador NLRP3.....	66
TABELA 9 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador Caspase-1.....	67
TABELA 10 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador Caspases 4/5	68
TABELA 11 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador IL1 β	69
TABELA 12 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador IL6	70
TABELA 13 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador IL18	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIM - *Apoptosis inhibitor of macrophage*

BAAR - Bacilo álcool-ácido resistente

D - Grupo de estudo dermatite de etiologia não infecciosa

DAB - Diaminobenzidina

DAMPs - *Damage-associated molecular patterns*

DD - Dimorfa-dimorfa

DT - Dimorfa-tuberculóide

DV - Dimorfa-virchowiana

DNA – Ácido desoxirribonucléico

HE - Hematoxilina-eosina

HT - Hanseníase tuberculoide

HDT - Hanseníase dimorfa tuberculoide

HDD - Hanseníase dimorfa dimorfa

HDV - Hanseníase dimorfa virchowiana

HV - Hanseníase virchowiana

IFNs - interferons

IFN- γ - Interferon gama

IKKs - I κ B kinases

IL-RA – Antagonista do receptor da interleucina-1

IL-1 β - Interleucina-1-beta

IL-4 - Interleucina 4

IL-6 - Interleucina 6

IL-10 - Interleucina 10

IL12B - Interleucina 12

IL-12 - Interleucina 12

IL-17 - Interleucina 17

IL-18 - Interleucina 18

LPS - Lipopolissacarídeo

MB – Multibacilar

MH – Mal de Hansen

MHB - Grupo de estudo hanseníase *borderline* ou dimorfa

MHT - Grupo de estudo hanseníase tuberculóide

MHV - Grupo de estudo hanseníase virchowiana

M. leprae - *Mycobacterium leprae*

M. tuberculosis - *Mycobacterium tuberculosis*

NFκb - Fator de transcrição nuclear

NLRs - NOD-like receptors

NLRP3 - *NLR family pyrin domain containing 3*

NOD - *Nucleotide-binding oligomerization*

PAMPs - *Pathogen-associated molecular patterns*

PB - Paucibacilar

PG - peptidoglicano

PRR - *Pattern recognition receptors*

Th1 – Resposta do Tipo 1

Th2 – Resposta do Tipo 2

TLR - *Toll-like receptors*

TNF – Fator de necrose tumoral

TT - Tuberculóide-tuberculóide

VV - Virchowiana-virchowiana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Hanseníase: aspectos conceituais	18
2.2 A epidemiologia da Hanseníase... ..	19
2.3 Classificações e formas anatomoclínicas da hanseníase	21
2.3.1 Forma Indeterminada.(MHI)... ..	22
2.3.2 Forma Tuberculoide (MHT).....	22
2.3.3 Forma <i>Borderline</i> ou Dimorfa (MHB)	23
2.3.4 Forma Virchowiana (MHV).....	24
2.4 A pele e imunologia da hanseníase	25
2.4.1 Resposta imune inata na hanseníase	25
2.4.2 Resposta imune adaptativa na hanseníase	27
2.5 Inflamassoma	29
2.6 Regulação do inflamassoma NLRP3 e evasão imune do <i>M. leprae</i>	31
3 OBJETIVOS	35
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Considerações éticas.....	36
4.2 Delineamento e estratégias do estudo.....	36
4.3 Critérios de seleção, inclusão e exclusão.....	37
4.4 Imuno-histoquímica.....	37
4.5 Análises estatísticas	39
5 RESULTADOS	40
5.1 NLRP3	43
5.2 Caspase-1	47
5.3 Caspases-4/5	51
5.4 IL-1 β	55

5.5 IL-6.....	58
5.6 IL-18.....	62
5.7 Escore da expressão imuno-histoquímica	66
6 DISCUSSÃO	74
7 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ANEXOS	90

1 - INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, negligenciada, causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo álcool-ácido resistente, intracelular obrigatório. Encontra-se endêmica em diversos países tropicais, particularmente se subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Apesar da sustentada redução na sua prevalência global, situada em 0,32 por 10.000 habitantes em 2014, um total de 105 países permanecem endêmicos ou com um ou mais doentes para cada 10.000 habitantes. Dentre esses países endêmicos, destaca-se o Brasil, que representa cerca de 90% dos casos prevalentes e dos casos novos na América do Sul e, juntamente com a Índia, cerca de 70% dos novos casos mundiais. (WHO, 2015)

Clínica e imunopatologicamente, a hanseníase apresenta-se como uma doença espectral entre os polos estáveis tuberculóide, de alta resistência à infecção bacilar, e virchowiano, de alta suscetibilidade, contendo formas intermediárias, instáveis ou de sobreposição da doença, denominadas dimorfias ou *borderline*. Essa apresentação espectral da doença expressa relação direta com o padrão de imunidade desenvolvido pelo hospedeiro, a partir do reconhecimento do *M. leprae* pelas células do sistema imune inato (Ridley e Jopling, 1966; Goulart *et al.*, 2002; Eichelmann *et al.*, 2013).

Para vários agentes microbiológicos, principalmente bacterianos, os processos de reconhecimento e indução da imunidade são bem conhecidos e estão relacionados aos receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), particularmente do grupo de receptores citosólicos do tipo NOD (NLRs), notadamente a subfamília chamada NLRP, que, quando acionada, forma complexos de sinalizações chamados inflamassomas, os quais podem induzir resposta inflamatória e piroptose (Latz *et al.*, 2013).

Inflamassomas são plataformas moleculares ativadas após a infecção ou agressão celular que desencadeiam a maturação de citocinas pró-inflamatórias, tais como interleucinas, para engatar defesas da imunidade inata (Schoroder e Tschopp, 2010). Piroptose, um processo de morte celular caspase-dependente, está intimamente correlacionada ao complexo de formação do inflamassoma em algumas situações. Em oposição à apoptose, uma forma imunologicamente silenciosa de morte celular, a piroptose é uma forma altamente inflamatória e imunogênica de morte das células e é comumente observada durante a infecção por patógenos (Bryant e Fitzgerald, 2009).

Atualmente, há grande controvérsia quanto a associação do inflamassoma à tuberculose. Fatores relacionados ao bacilo *Mycobacterium tuberculosis* foram associados tanto à ativação de caspase-1 em macrófagos com infecção primária, sugerindo participação dos biomarcadores do inflamassoma na tuberculose, quanto à inibição do inflamassoma NLRP3, sugerindo mecanismo de evasão do *Mycobacterium tuberculosis* a partir da inativação de mediadores inflamatórios por óxido nítrico. (Brodsky e Monack, 2009; Master *et al*, 2008; Mishra *et al*, 2013).

Na hanseníase, apesar do seu impacto em Saúde Pública e da sua manifestação espectral e clinicopatológica estritamente dependente da imunidade inata, as evidências da participação ou não do inflamassoma na sua patogênese são muito recentes e escassas e pouco relacionadas à histopatologia da doença. Dentre elas, somente as publicações indexadas de Costa e colaboradores (2008), que avaliaram o padrão de expressão da IL-1 β e seu receptor antagonista em hansenianos, de Pontillo e colaboradores (2013), que associaram haplótipos NLRP1 à hanseníase, e de Yonn e colaboradores (2016), que relacionaram o efeito anti-inflamatório da clofazimina à redução de biomarcadores do inflamassoma, além de Dissertação de apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu – São Paulo (Gigliotti, 2014), abordam esse problema mais diretamente.

Considerando-se ainda as significativas limitações do uso de culturas do *M. leprae* e de modelos animais para estudos clássicos de patogênese, a caracterização imunofenotípica direta, em amostras de pele humana, dos biomarcadores do inflamassoma nas diferentes formas imunopatológicas da hanseníase se justifica e poderá auxiliar o melhor entendimento da predição das evoluções clínicas da doença e a busca ou desenvolvimento de marcadores de evolução da morbidade, prognóstico e resposta terapêutica, razões que motivaram essa investigação.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2 - REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Hanseníase: aspectos conceituais

A hanseníase, também chamada de Mal de Hansen (MH), é uma doença infectocontagiosa, crônica e granulomatosa, endêmica em regiões subdesenvolvidas, causada por um parasito intracelular obrigatório, o *Mycobacterium leprae*, que afeta a pele e os nervos do sistema nervoso periférico, e algumas vezes, outros tecidos, notadamente os olhos, a mucosa do trato respiratório superior, músculos, ossos e testículo (Eichelmann *et al.*, 2013).

O *Mycobacterium leprae* é um bacilo reto ou ligeiramente encurvado, de extremidades arredondadas, álcool-ácido-resistente (BAAR), identificado pelo bacteriologista e dermatologista norueguês Gerhard Henrik Armauer Hansen, no século XIX, que mede 0,3 a 0,4 µm de largura por 1 a 8 µm de comprimento e encontra-se isolado, agrupado ou solidamente unido e envolto por uma substância chamada gléia, formando globias. Tem um ciclo evolutivo muito lento (11 a 16 dias), podendo sobreviver de 36 horas a 9 dias, e apresenta envelope celular formado por membrana plasmática, parede celular, pseudobicamada lipídica e cápsula. O lipídio dominante da parede celular que confere ao *M. leprae* especificidade imunológica é o PGL-1 (um tipo de glicolipídio fenólico) (Hansen, 1874; Eichelmann *et al.*, 2013; Kowalska e Kowalic, 2012; Bhat e Prakash, 2012; Scollard *et al.*, 2006; Rodrigues e Lockwood, 2011).

A principal fonte de infecção da hanseníase é o doente bacilífero. A infectividade é elevado, contudo sua patogenicidade é baixa. As vias aéreas superiores são consideradas as principais portas de entrada do bacilo, sendo a transmissão através de contágio direto, embora haja a possibilidade de se processar por mecanismo indireto (objetos contaminados, vetores). A inoculação ocorre pela mucosa nasal e, por exceção, através de soluções de continuidade da pele (Bhat e Prakash, 2012; Silva *et al.*, 2013; Walker e Lockwood, 2007).

2.2 - A epidemiologia da hanseníase

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) foram diagnosticados no mundo, 213.899 casos de hanseníase em 2014, dos quais 125.785 são novos casos da Índia (país com o maior número de casos do mundo). No Brasil, segundo lugar no ranking de casos mundiais, foram notificados 31.064 novos casos no ano de 2014 (FIGURA 1) (WHO, 2014).

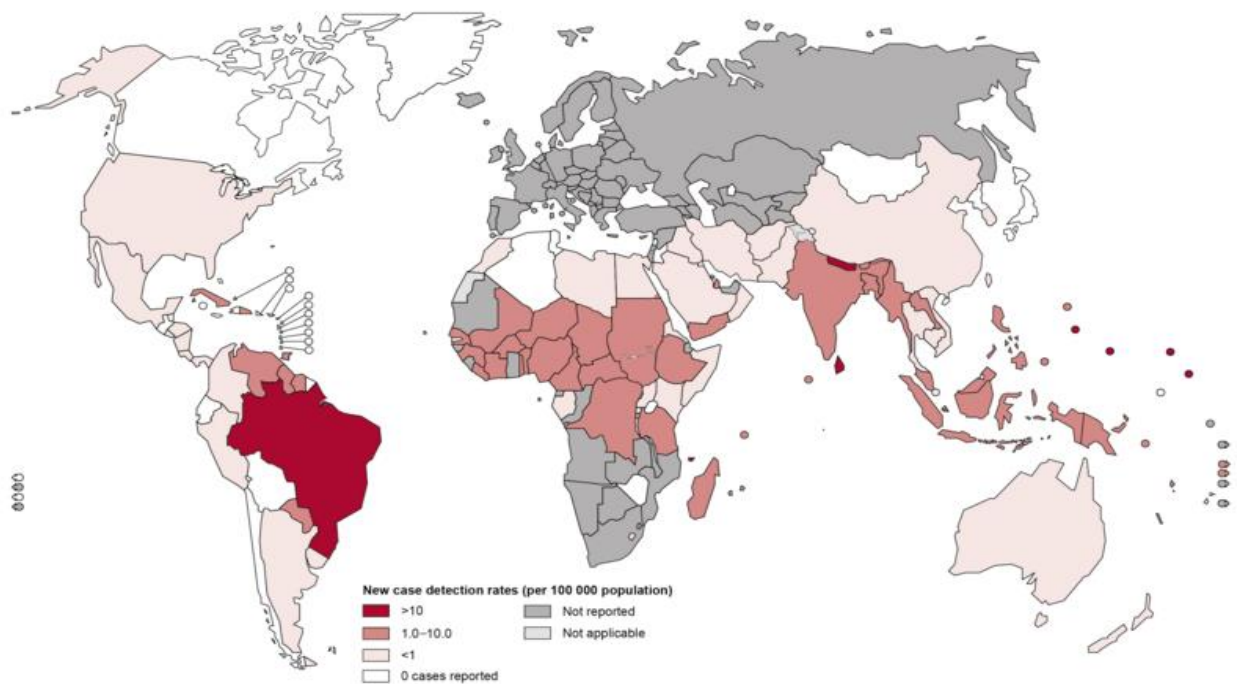


FIGURA 1 – Novos casos de hanseníase, por 100.000 habitantes, no mundo, em 2014. “New case detection rates (per 100.000 population)”: Taxa de detecção de casos novos (para cada 100.000 habitantes). “>10”: Maior que 10. “\Less than 10”: menor que 10. “0(no cases reported)”: 0 (nenhum caso notificado). “No data available”: dados não disponíveis. Fonte: Organização Mundial de Saúde – Mapas de hanseníase. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>.

O Brasil pode ser considerado hiperendêmico como um todo, de acordo com a Secretaria de Vigilância Sanitária Brasileira, porém a ocorrência de casos novos nos últimos anos não se distribui de maneira homogênea no território nacional, sendo as regiões mais acometidas: Norte, Centro-Oeste e Nordeste, com coeficientes de detecção acima do nacional, seguidos pelo Sudeste e Sul, como explicitado na FIGURA 2 (Oliveira, Fernandes, Lima, 2014).

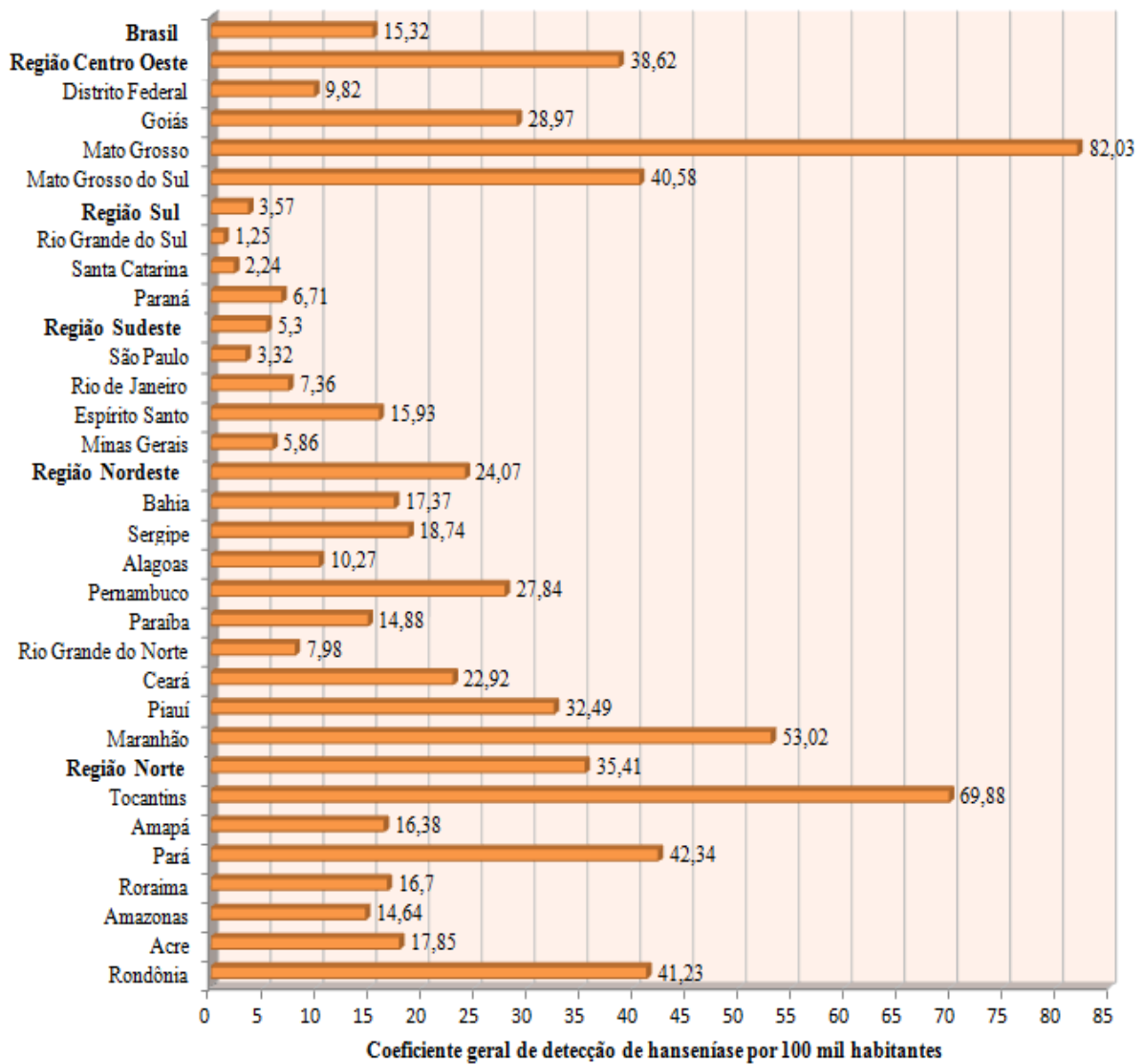


FIGURA 2 - Coeficiente geral de detecção de hanseníase por 100 mil habitantes, segundo regiões geográficas e Unidades da Federação. Brasil, 2014. Fonte: MS/SVS/Sinan Net

Essa taxa de detecção de hanseníase na população ou taxa de incidência de hanseníase demonstrada acima (FIGURA 2) se refere ao número de casos novos diagnosticados de hanseníase (código A30 da CID-10), por 100 mil habitantes, na população residente em determinado espaço geográfico, no ano considerado. Outra observação importante a partir da interpretação da FIGURA 2 é a ocorrência de coeficientes estaduais acima da média nacional em 16 Estados da Federação.

2.3 – Classificações e formas anatomoclínicas da hanseníase

As manifestações clínicas da hanseníase são expressão de uma complexa resposta imunológica do hospedeiro à infecção, levando assim a um espectro imunológico, clínico e histológico característico. Esta variabilidade, que está associada às diferentes respostas imunológicas do hospedeiro humano frente ao bacilo, ocorre particularmente na pele e tratos nervosos periféricos, em função do tropismo de macrófagos dérmicos e células de Schwann (Scollard *et al.*, 2006; Miranda *et al.*, 2012; Eichelmann *et al.*, 2013; Teles *et al.*, 2013).

Na tentativa de uniformizar e padronizar a nomenclatura, foi estabelecida, no Congresso Internacional de Hanseníase de 1953, a Classificação de Madri, fundamentada nas características clínicas e aspectos da baciloscopia, polarizando a hanseníase em dois eixos estáveis e opostos (virchowiano e tuberculóide) e dois grupos instáveis: a forma I (incharacterístico, indeterminado), que pode evoluir para qualquer forma da doença, manter-se como forma I ou curar-se espontaneamente, e a forma dimorfa (*borderline*) (Talhari, Talhari, Penna, 2015; Lastória, Abreu, 2014).

Em 1962, foi proposta uma classificação fundamentada em critérios clínicos, histológicos, bacteriológicos e imunológicos, a qual distingue cinco formas da doença: tuberculóide polar (TT), virchowiana polar (VV), dimorfa-tuberculóide (DT), dimorfa-virchowiana (DV), dimorfa-dimorfa (DD). Esta classificação tem sido adotada em pesquisas científicas em função de sua abrangência de critérios e é utilizada universalmente (Ridley e Jopling, 1962; Eichelmann *et al.*, 2013).

A OMS estabeleceu, em 1982, uma forma de classificação simplificada, fundamentada no índice baciloscópico (IB): os indivíduos doentes com IB menor que 2+ são considerados paucibacilares e aqueles com IB maior ou igual a 2+ (WHO, 1982). Em 1988, a OMS sugeriu uma classificação com base em critérios puramente clínicos (número de lesões cutâneas), para viabilizar as ações operacionais, considerando como casos paucibacilares aqueles com até cinco lesões de pele, e multibacilares, os com mais de cinco lesões (WHO, 1988). A sensibilidade e especificidade da classificação baseada em lesões de pele, com relação aos resultados dos exames baciloscópicos, mostraram valores de 89,6% e 83,8%, respectivamente (Gallo *et al.*, 2003). A legislação brasileira valida o uso, para orientação terapêutica, da classificação recomendada pela OMS, baseada nas lesões cutâneas; a baciloscopia de pele, quando disponível, deve ser utilizada como dado complementar (Ministério da Saúde, 2000).

Mais detalhadamente, essas formas clínicas e histopatológicas da hanseníase, associadas aos aspectos clínicos, histológicos e bacteriológicos, estão descritas a seguir:

2.3.1 - Forma Indeterminada (MHI)

Considerada a primeira manifestação da doença. Caracteriza-se por máculas hipocrômicas ou eritemato-hipocrômicas, mal definidas, com hipoestesia, além de distúrbios de sudorese e vasomotores. Usualmente há perda de pelos na região acometida, não se observando comprometimento de troncos nervosos nesta forma clínica. A baciloscopia, nestes doentes, é negativa. O quadro histopatológico é, habitualmente, representado por infiltrado linfo-histiocitário perianexial inspecífico ou pequeno infiltrado inflamatório mononuclear perianexial, perivascular e/ou em torno de filetes nervosos, por vezes invadindo-os e delimitando-os. Pode-se observar degeneração vacuolar dos ceratinócitos da camada basal da epiderme e exocitose de linfócitos (Bhat e Prakash, 2012; Talhari, Talhari, Penna, 2015; Massone, Belachew, Schettini, 2014).

2.3.2 - Forma Tuberculóide (MHT)

Trata-se da forma com lesões únicas ou em pequeno número, de distribuição assimétrica, pequena dimensão, contornos bem definidos e elevados, cor hipocrômica e/ou eritematosa e/ou acastanhada, formando lesões circulares, anulares, circinadas ou geográficas. O centro da lesão é atrófico, podendo exibir anidrose. Pode haver lesão de nervos, além de disfunção sensorial/ motora, notadamente quando a lesão se dá em mãos e pés. As lesões são comumente secas, sem pelos e anestésicas em função da destruição de fibras nervosas dérmicas. A baciloscopia é negativa e a reação de Mitsuda é positiva. Histologicamente, observa-se infiltrado inflamatório granulomatoso, perianexial (com envolvimento do músculo eretor do pelo e de glândulas sudoríparas). O granuloma não é caseoso e apresenta células epitelioides com células gigantes, com um manto de linfócitos na periferia. Plasmócitos estão ausentes. Dentro dos granulomas, pequenos nervos podem ser destruídos e o espessamento nervoso pode ser acentuado (Lastória, Abreu, 2014; Massone, Belachew, Schettini, 2014).

2.3.3 Forma Dimorfa ou *Borderline* (MHB)

Trata-se do grupo dimorfo, que apresenta diferentes manifestações clínicas em função dos vários graus de resposta imune ao *M. Leprae*. A instabilidade é um aspecto marcante (Ridley e Jopling, 1966; Talhari, Talhari, Pena, 2015). Este grupo é subdividido em:

Forma Dimorfa tuberculoide (MHBT): As lesões de pele têm aspectos semelhantes às observadas na forma tuberculoide, notadamente quanto aos aspectos de apresentação dermatológica e perda de sensibilidade. No entanto, tendem a ser maiores e em maior número, podendo manifestar-se através de placas de limites pouco nítidos em parte ou totalidade das lesões. O espessamento de nervos tende a ser irregular. A baciloscopia pode ser positiva ou negativa. Na histopatologia, há infiltrado inflamatório semelhante ao da forma MHT, porém com histiócitos menos epitelioides, e linfócitos dispostos de forma mais difusa e irregular, com aspecto granulomatoso mais desorganizado. Células gigantes podem ser encontradas (Ridley e Jopling, 1966; Eichelmann *et al.*, 2013; Talhari, Talhari, Pena, 2015; Massone, Belachew, Schettini, 2014).

Forma Dimorfa-dimorfa (MHBB): as lesões exibem aspectos intermediários entre os pólos tuberculoide e virchowiano, inclusive quanto ao número e tamanho, e são acobreadas/avermelhadas, de distribuição assimétrica; manifestando-se como placas de limites indefinidos e hipopigmentação central. Pode se manifestar através de placas, máculas, nódulos e pápulas, sendo a forma mais instável do espectro. A baciloscopia geralmente é negativa. O aspecto histopatológico mostra granulomas epitelioides, todavia mal definidos, com células macrófagicas imaturas e linfócitos distribuídos difusamente (Ridley e Jopling, 1966; Massone, Belachew, Schettini, 2014).

Forma Dimorfa-virchowiana (MHBV): as lesões são infiltradas e a coloração varia do eritema ao aspecto ferruginoso, assemelhando-se à forma virchowiana, porém sem uma distribuição tão simétrica, inclusive em relação ao comprometimento de nervos. Por vezes, a infiltração de um único lóbulo auricular define o diagnóstico. A baciloscopia é fortemente positiva. Ao exame

histopatológico, observam-se macrófagos (por vezes espumosos) misturados com linfócitos, distribuídos difusamente, ou ao redor de anexos e vasos, podendo haver grupos focais de células epitelioides. Há uma zona delgada de colágeno (faixa de Unna) abaixo da epiderme (Ridley e Jopling, 1966; Massone, Belachew, Schettini, 2014).

2.3.4 - Forma Virchowiana (MHV)

Caracteriza-se por lesões cutâneas eritemato-acastanhadas ou eritemato-amareladas, múltiplas e infiltradas, de limites imprecisos, geralmente simétricas e distribuídas por todo o corpo. Tubérculos e nódulos são as formas mais frequentes, havendo ainda pápulas e placas isoladas ou agrupadas. A infiltração difusa da face com a preservação dos cabelos dá o aspecto de “*facies leonina*”. Os pavilhões auriculares encontram-se infiltrados, com presença de madarose bilateral. A anestesia é caracteristicamente em “luva” e “bota”. As mucosas orofaríngea, ocular e nasal também apresentam-se infiltradas. Pode haver adenopatia e comprometimento de outros órgãos (laringe, baço, fígado, testículos, e outros). A baciloscopia é sempre positiva com vários bacilos isolados em globias múltiplas. O padrão microscópico revela macrófagos espumosos cinzentos na derme (células de Virchow), contendo grande número de bacilos. Os linfócitos são poucos e distribuídos difusamente. Coexiste a faixa de Unna, separando a derme da epiderme, a qual encontra-se retificada. O infiltrado inflamatório tende a ser profundo (Ridley e Jopling, 1966; Lastória, Abreu, 2014; Massone, Belachew, Schettini, 2014).

A pele, como mencionado acima, é o espaço anatômico mais frequentemente associado ao desenvolvimento das formas clínicas e histopatológicas da hanseníase, porque nela acontecem os fenômenos das respostas inflamatória e imune.

2.4 - A pele e imunologia da hanseníase

A pele é um órgão complexo e dinâmico, que tem por principais funções a proteção/ barreira dos tecidos subjacentes, regulação térmica, reserva nutricional, recepção de estímulos nervosos e, também, regulação dos eventos inflamatórios, inclusive regulação imune a infecções (Salmon, Armstrong, Ansel, 1994; Richmond, Harris, 2014).

A pele humana tem dois compartimentos principais, assim denominados epiderme e derme. A epiderme é formada principalmente por ceratinócitos, que produzem o estrato córneo e mantém as junções, estabelecendo a função de barreira. Além disso, pode contribuir para a regulação inflamatória já que pode expressar o complexo principal de histocompatibilidade de classe II (MHC II) e secretar citocinas (Nestle *et al.*, 2009; Richmond, Harris, 2014).

A derme é dividida em: derme papilar (mais superficial) e reticular (mais profunda). É constituída principalmente por proteínas da matriz extracelular que proporcionam as propriedades de resistência e elasticidade, e também possui maior variabilidade de tipos celulares, inclusive células inflamatórias/ imunológicas especializadas (linfócitos T helper, CDs e células NK), macrófagos, mastócitos, dentre outras (Nestle *et al.*, 2009; Richmond, Harris, 2014).

Numa cascata de resposta imune cutânea, as células residentes são ativadas, secretando citocinas pró-inflamatórias, que recrutam células efetoras, como os neutrófilos. As células do sistema imune inato podem, portanto, iniciar o ataque ao agente agressor, contudo uma resposta efetiva e eficaz geralmente requer o envolvimento do sistema adaptativo, com o reconhecimento das células afetadas (Richmond, Harris, 2014).

2.4.1 – Resposta imune inata na hanseníase

Em relação à hanseníase, o primeiro obstáculo ao *M. Leprae* é a imunidade inata, representada inicialmente pela integridade do epitélio e secreção de imunoglobulina de superfície A (IgA). As células efetoras mais importantes desta plataforma de imunidade são: células dendríticas, macrófagos, neutrófilos e células NK, que reconhecem o bacilo (Modlin, *et al.*, 2010; Talhari, Talhari, Penna, 2015).

Esses receptores de reconhecimento padrão (PRRs) detectam estruturas microbianas altamente conservadas e estão intimamente ligados às vias de transdução de sinal intracelular,

que ativam genes responsáveis pela resposta imunológica, em especial no desencadeamento da resposta inflamatória pela secreção de citocinas, indução da expressão de moléculas de adesão e co-estimulatórias e recrutamento de células envolvidas no desenvolvimento da resposta imune adaptativa (Modlin, *et al.*, 2010; Talhari, Talhari, Penna, 2015).

Os PRRs pertencem a diferentes classes de receptores, tais como os *Toll-like receptors* (TLR), receptores do tipo NOD (NLR), receptores do tipo RIG-I (RLRs), e os receptores do tipo lectina C (CLRs). Dentre esses, os TLR e NLR estão mais relacionados à hanseníase. Os receptores do tipo TLR atuam via homodimerização. Entretanto, na hanseníase, podem formar dímeros transmembrana, como TLR2/6 e TLR2/6 e ativar, no epitélio e nos macrófagos, a produção das citocinas IL-6, IL-8 e IL-10 (Modlin, *et al.*, 2010; Talhari, Talhari, Penna, 2015).

Os TLR ativam, dentre outros, o fator de transcrição chamado NFκB, o qual é requerido para a expressão de muitos genes relacionados com a imunidade inata e com a inflamação, por meio do domínio citoplasmático TIR. O reconhecimento do ligante pela porção extracelular do TLR induz a ligação do domínio TIR à proteína adaptadora e sua ativação. Na sequência, uma série de ativações em cascata fosforila, em última etapa, a proteína inibidora IκB, que se encontra complexada ao fator de transcrição NFκB no citosol. Essa última fosforilação libera o NFκB no núcleo e permite sua ligação a vários promotores de genes, como de proteínas NLR de citocinas pró-inflamatórias (Modlin, *et al.*, 2010; Talhari, Talhari, Penna, 2015).

Além dos TLR, os NLR, que são caracterizados estruturalmente por uma região C-terminal que contém uma série de LRRs e um domínio central de ligação a nucleotídeos e oligomerização, denominado NOD, reconhecem macromoléculas como o muramil dipeptídeo e podem ativar a clivagem proteolítica e produção das citocinas. Entre os NLR, os receptores NLRP3 são, dentre outros, capazes de ativar a Caspase 1, etapa fundamental para o processamento e ativação das citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18, principalmente (Modlin, *et al.*, 2010; Talhari, Talhari, Penna, 2015).

2.4.2 – Resposta imune adaptativa na hanseníase

A resposta imune inata efetiva depende das CDs: tais células são as primeiras que encontram os bacilos, podendo apresentá-los aos linfócitos TCD8+ (via moléculas do MHC de

classe I) ou TCD4+ (através do MHC de classe II), com consequente produção de citocinas e quimiocinas. Esta resposta, associada ao padrão de baixa virulência manifestado pelo bacilo de Hansen, podem ser o eixo para a resistência de manifestações clínicas da hanseníase, assim como para a determinação do eixo de padrão de desenvolvimento da doença (virchowiano ou tuberculoide) (Scollard *et al.*, 2006; Gulia, Fried, Massone, 2010; Lastória, Abreu, 2014) (FIGURA 3).

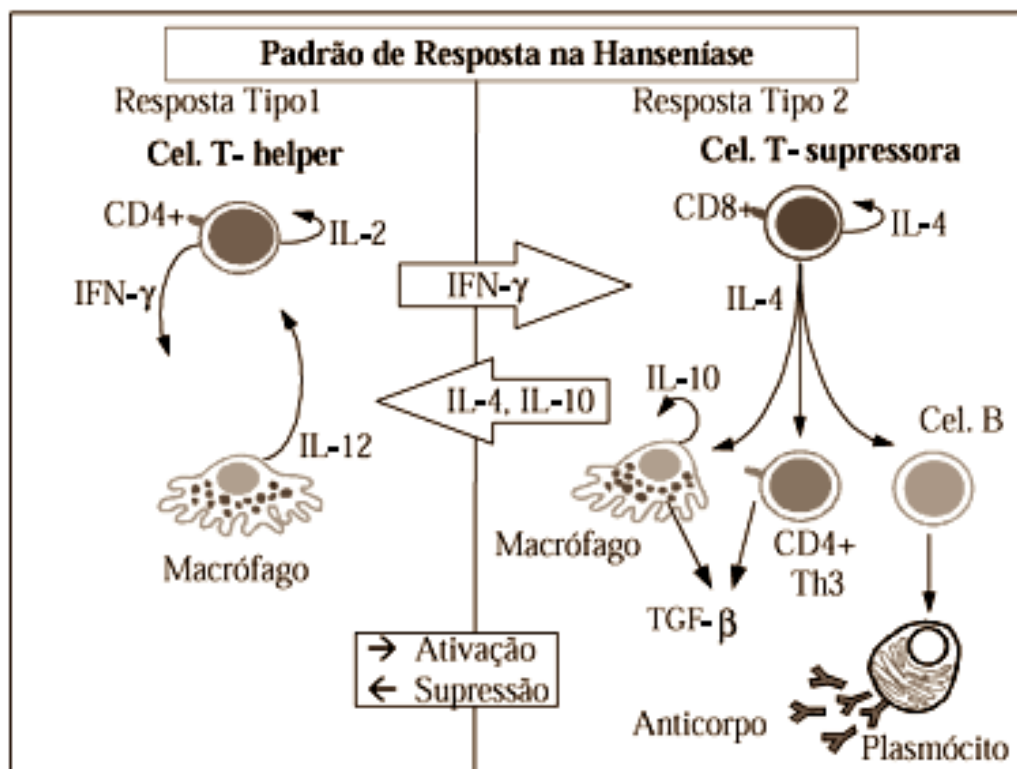


FIGURA 3 – Padrões de resposta imune na Hanseníase. No padrão de resposta tipo 1, observado na forma tuberculoide, a IL-2 ativa macrófagos via IFN-g (imunidade mediada por célula). No padrão de resposta tipo 2, na forma virchowviana, a IL-4 favorece a diferenciação de células B para produção de anticorpos (imunidade humoral). Adaptado de Goulart, Penna e Cunha, 2002.

Os macrófagos dérmicos são essenciais na patogênese da hanseníase, não só como apresentadores de antígenos a linfócitos TCD4 e TCD8, como também na formação do granuloma e seu papel na contenção da disseminação do bacilo (Ramakrishnan, 2012).

A resposta imune adaptativa é constituída pela relação de linfócitos, CDs, macrófagos e elementos solúveis como os anticorpos que capturam microrganismos livres, assim como citocinas que deterioram patógenos (Mendonça *et al.*, 2008; Lastória, Abreu, 2014). É dividida em celular (tipo 1) e humoral (tipo 2). A capacidade dos macrófagos de suscitar uma resposta

celular ou humoral está associada aos tipos de citocinas envolvidas, induzindo o desenvolvimento das respostas Th1 e Th2 (Mendonça *et al.*, 2008). Na resposta de células Th1, há secreção de interleucina 2 (IL-2), interleucina 12 e interferon γ (IFN- γ), as quais ativam os macrófagos. As células Th2, que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, são estímulo para a produção de anticorpos e inibem a ativação macrofágica. Há ainda as células Th17, que estão integradas às respostas inflamatórias e de autoimunidade através da produção de IL-17 e IL-22 (De Souza *et al.*, 2016).

Como já mencionado anteriormente, o tipo dessa resposta imune adaptativa, principalmente Th1 ou Th2, frente à infecção pelo bacilo de Hansen, pode influenciar a resposta à doença e está associado às diferentes manifestações clínicas dos eixos MHT e MHV, respectivamente (Mendonça *et al.*, 2008). Por sua vez, essa apresentação espectral da doença expressa relação direta com o padrão de imunidade desenvolvido pelo hospedeiro, a partir do reconhecimento do *M. leprae* pelas células do sistema imune inato (Ridley e Jopling, 1966; Goulart *et al.*, 2002; Eichelmann *et al.*, 2013; Nath, Saini, Valluri, 2014; Hall, 2011).

Para vários agentes microbiológicos, principalmente bacterianos, os processos de reconhecimento e indução da imunidade são bem conhecidos e estão relacionados aos receptores de reconhecimento de padrão (PRR), particularmente do grupo de receptores citosólicos do tipo NOD (NLR), notadamente a subfamília chamada NLRP, que, quando acionada, forma complexos de sinalizações chamados inflamassomas, os quais podem induzir resposta inflamatória e piroptose e, conseqüentemente, as respostas imunes adaptativas celular e humoral (Latz *et al.*, 2013).

2.5 - Inflamassomas

Inflamassomas são plataformas moleculares do tipo complexo multiproteico intracelular, ativadas após a infecção ou agressão celular que atuam na ativação de enzimas da família cisteína-aspartato proteases (Caspases) e desencadeiam a maturação de citocinas pró-

inflamatórias, tais como interleucinas, para engatar defesas da imunidade inata frente a variados sinais de perigo (Schoroder e Tschopp, 2010; Paiva-Oliveira, 2012).

Inflamassomas apresentam, em sua estrutura, um receptor NRL, uma proteína adaptadora ASC (*apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD – caspase activation and recruitment domains*), além de uma caspase-1 ativa, agindo como mediadores da resposta imune inata (Zoete *et al.*, 2014) (FIGURA 4).

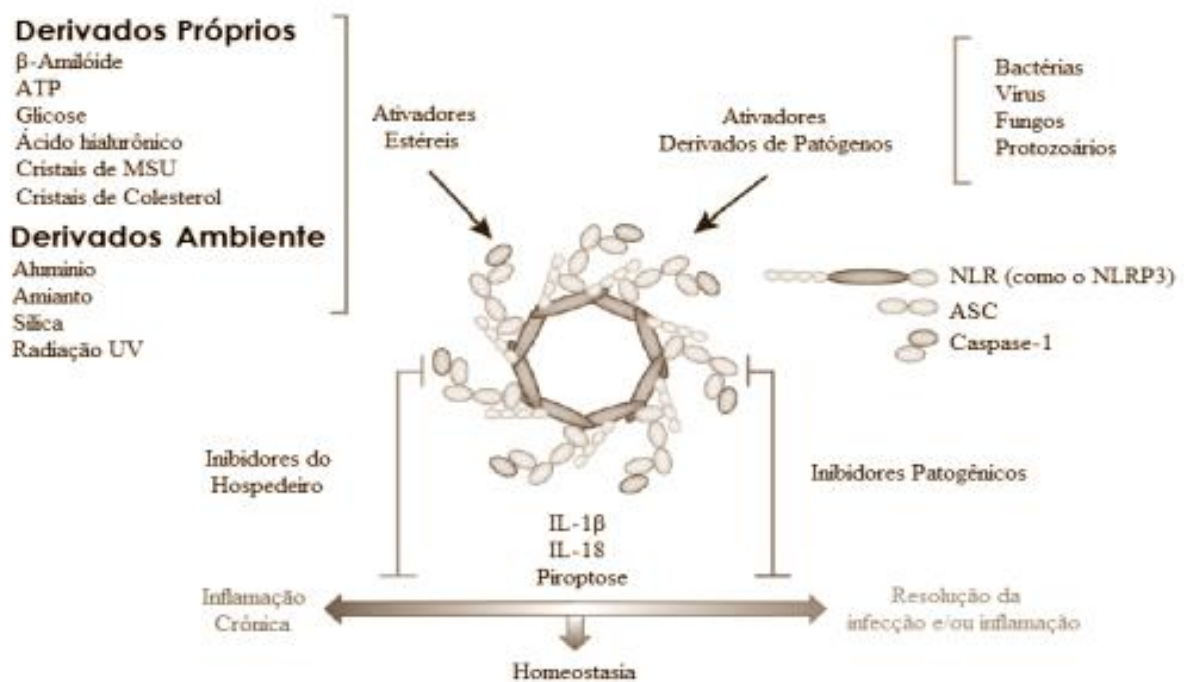


FIGURA 4 – O inflamassoma: ativação e estrutura. A ativação dos inflamassomas por PAMPs ou DAMPs é necessária para o recrutamento de células da resposta imune, assim como para inicialização do processo de reparo. A ativação depende do reconhecimento de agentes microbiológicos por meio dos PRR. Inibidores do inflamassoma são provenientes do hospedeiro e do próprio patógeno, caracterizando mecanismo de evasão imune. Adaptado de Henao-Mejia *et al.*, 2012.

O papel exato de alguns inflamassomas é desconhecido. Entretanto, diferentes estudos já mostraram a associação dos inflamassomas com diferentes doenças metabólicas, neurodegenerativas, assim como infecciosas, dentre outras, indicando que há uma participação do inflamassoma na patogênese e modulação, o que transforma a pesquisa com inflamassomas em um possível e promissor alvo terapêutico (Schoroder e Tschopp, 2010).

O inflamassoma NLRP3 é ainda o mais estudado. É induzido pelo envolvimento de diferentes componentes de origem bacteriana, viral, padrões de perigo estéreis tais como cristais de ácido úrico, agentes externos como sílica, amianto, dentre outros (Veerdonk *et al.*, 2011).

Pela via clássica, dois sinais são necessários para ativar os receptores NLRP3: 1º sinal) ativação do fator de transcrição NFκB via TLR; 2º sinal) fatores citoplasmáticos associados à presença de microorganismos e/ou dano de organelas celulares, como efluxo de potássio, aumento da concentração de cálcio ou dano mitocondrial. Transcritos e ativados, os NLRP3 formam um complexo com e ativam a Caspase 1, que, por sua vez, ativa as citocinas pró-inflamatórias IL-1β e IL-18 (He *et al.*, 2016).

A Caspase-1 é uma enzima da família de cisteína-aspartato proteases (Cysteiny-ASpartate proteASES) envolvida no processo inflamatório. Sintetizada com 45 kD (p45), é denominada inicialmente procaspase-1, e quando ativada pelo inflamassoma é clivada em proteínas de 20 kD (p20) e 10 kD (p10) que formam um complexo heterotetramérico que expressa uma potente atividade enzimática e tem como principais substratos a pró-IL-1β e a pró-IL-18. Além disso, a Caspase-1 também é capaz de executar um programa de morte celular rápida, denominado piroptose, que é exercido pelos macrófagos, em resposta às bactérias intracelulares. Em oposição à apoptose, uma forma imunologicamente silenciosa de morte celular, a piroptose é uma forma altamente inflamatória e imunogênica de morte das células e é comumente observada durante a infecção por patógenos (Bryant e Fitzgerald, 2009; Fernández e Lamkanfi 2015).

A IL-1β é produzida na forma inativa, a pró-IL-1β, que é clivada pela Caspase-1 na sua forma biologicamente ativa. A Caspase-1 promove ainda a clivagem da pró-IL-18, que na sua forma biologicamente ativa, induz a imunidade mediada por células. Em resposta à IL-18, há uma intensa produção de IFN-γ pelos linfócitos T helper, os quais ativam macrófagos e outras células do sistema imune desenvolvendo um elo entre a imunidade inata e adaptativa (Fernández e Lamkanfi, 2015).

Além da ativação pela via clássica, o inflamassoma NLRP3 pode ser ativado diretamente pelas caspases inflamatórias e homólogas 4/5, nos humanos, 11, nos camundongos. O mecanismo exato da ativação do inflamassoma NLRP3 via Caspases 4/5 ainda não está bem definido, mas aceita-se que os próprios agentes microbiológicos podem ativá-las, por ligação direta com domínios da própria caspase. Isso resulta na maturação e liberação de IL-1β/IL-18

por processos citoplasmáticos dependentes de NLRP3 e de Caspase-1 (Stowe *et al.*, 2015; Fernández e Lamkanfi, 2015).

2.6 – Regulação do inflamassoma NLRP3 e evasão imune do *M. leprae*

Na imunopatogênese da hanseníase, as evidências da participação ou não do inflamassoma e os possíveis mecanismos de evasão imune do *M. Leprae* são muito recentes e escassas, tornando esse fato o principal problema deste estudo.

Em se tratando dos mecanismos gerais de regulação do inflamassoma NLRP3 nas mais diversas nosologias, o modelo dos dois sinais para a sua ativação pela via clássica já está bem consolidado, com participação importante do NFkB no primeiro sinal e dos elementos efluxo de potássio, aumento intracelular de cálcio, ruptura mitocondrial no segundo sinal. Além dessa via clássica, são também muito relevantes as vias não-canônica e alternativa (He *et al.*, 2016).

A via não-canônica requer ativação prévia das homólogas caspases inflamatórias 4, 5 e 11 diretamente pelos produtos ou partículas microbianos, como o lipossacarídeo (LPS) das bactérias Gram negativo. A via alternativa é ativada diretamente por moléculas microbianas, como o LPS, por mecanismos ainda pouco esclarecidos que requerem a participação da Caspase-8. Uma vez constituído, o inflamassoma NLRP3, por meio da Caspase 1, atua na maturação e liberação de IL-1 β /IL-18. (He *et al.*, 2016).

Considerando a participação essencial do inflamassoma NLRP3 na imunopatogênese de algumas doenças, tanto YANG e colaboradores (2017), quanto SHAO e colaboradores (2015) revisaram diversos mecanismos de regulação pós-transcricional e inibitórios, respectivamente.

Nessas revisões, há definição clara dos mecanismos combinados de fosforilação, ubiquitinação, processamento proteolítico, nitrosilação e ribosilação provocando modificações nas principais moléculas e estruturas do inflamassoma, além da descrição de moléculas específicas, como interferons do Tipo I, microRNA-223, e de moléculas indutoras de autofagia, como Resveratrol, que potencialmente inibem o inflamassoma NLRP3 (Yang *et al.*, 2017; Shao *et al.*, 2015).

Entretanto, permanecem ainda muito restritas as informações sobre a participação de micobactérias nesses processos de ativação e regulação dos inflamassomas. Exceto por estudos relacionados ao *M. tuberculosis*, cuja participação na regulação do inflamassoma é considerada muito complexa e predominantemente inibitória da sua ativação, trabalhos direcionados ao *M. leprae* são relativamente raros e controversos (Master *et al.*, 2008; Briken *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2017).

A ativação da Caspase-1 e a secreção de IL-1 β em macrófagos foi avaliada por Kang e colaboradores (2010). Eles demonstraram a redução na ativação da Caspase-1 e na secreção de IL-1 β , em macrófagos da linhagem A/J, após estímulo com o *M. leprae*, indicando mecanismo de evasão desse agente. Diferentemente, Costa e colaboradores (2008) demonstraram altos níveis de IL-1 β em pacientes com hanseníase independente da forma clínica, em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo ativação da resposta imune celular.

Em relação ao produto do inflamassoma IL-18, Garcia e colaboradores (1999) quantificaram a expressão de mRNA para IL-18 nos hansenianos e documentaram maior expressão desse biomarcador nas lesões tuberculóides do que nas lesões virchowianas e pele normal de indivíduos saudáveis. Além disso, demonstraram aumento na produção de mRNA da IL-18 e a produção de IFN- γ , mas não de IL-4, nas culturas dos pacientes tuberculóides. Para completar, mais recentemente, evidências indicaram fortemente a modulação da produção de IL-1 β e IL-6 via indução do antagonista do receptor de IL-1 β .

Assim, diante do problema apresentado acima, a caracterização imunofenotípica direta, em amostras de pele humana, dos biomarcadores do inflamassoma nas diferentes formas imunopatológicas da hanseníase produzirá conhecimento para auxiliar o melhor entendimento da predição das evoluções clínicas da doença e a busca ou desenvolvimento de biomarcadores de evolução da morbidade, prognóstico e resposta terapêutica, razões que motivaram essa investigação.

3 - OBJETIVOS

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Associar biomarcadores do inflamassoma às diferentes formas imunopatológicas da hanseníase.

3.2 - Objetivos específicos

- a) Rever e padronizar a classificação histopatológica das biópsias de pele selecionadas;

- b) Descrever os padrões epitelial, dérmico e endotelial da expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores NLRP3, caspases1 e 4/5, IL-1 β , IL-6 e IL-18 nas formas imunopatológicas polares e interpolar da hanseníase;

- c) Estabelecer escores dos padrões epitelial, dérmico e endotelial de expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores NLRP3, caspases1 e 4/5, IL-1 β , IL-6 e IL-18 nas formas imunopatológicas polares e interpolar da hanseníase;

- d) Comparar os escores dos padrões epitelial, dérmico e endotelial de expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores NLRP3, caspases1 e 4/5, IL-1 β , IL-6 e IL-18 nas formas imunopatológicas polares e interpolar da hanseníase.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Considerações éticas

Todas as recomendações e normas de pesquisas envolvendo seres humanos, contidas na Resolução 466 / 2012 do Conselho Nacional de Saúde, para salvaguardar os direitos e o bem-estar das pessoas estudadas, foram adotadas nesse estudo. Este projeto foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob o parecer nº CAAE 14887414.0.0000.5149.

4.2 - Delineamento e estratégias do estudo

Trata-se de estudo observacional, transversal e comparativo dos aspectos de marcação imuno-histoquímica de total de 99 amostras (biopsias) de lesões cutâneas de pele de pacientes com diagnóstico ou suspeita diagnóstica de hanseníase, no período de 2000 a 2015, oriundos do Ambulatório de Hanseníase do Anexo de Dermatologia Osvaldo Costa do Hospital das Clínicas da UFMG. O cálculo amostral, elaborado com nível de confiança de 95%, erro máximo de 2,5% e prevalência da hanseníase em Minas Gerais de 0,44 casos/10.000 habitantes, indicou tamanho amostral ideal de 25 amostras em cada grupo, para comparação.

Considerando aspectos clínicos e imunopatológicos (Classificação de Madri) da Hanseníase, foram definidos os seguintes grupos para estudo:

- Grupo MHV: pacientes com diagnósticos clínico e/ou laboratorial das formas multibacilares Virchowiana e *borderline* Virchowiana (faixa Virchowiana ou lepromatosa da Hanseníase);
- Grupo MHT: pacientes com diagnósticos clínico e/ou laboratorial das formas paucibacilares Tuberculosa e *borderline* Tuberculóide (faixa Tuberculosa da Hanseníase);

- Grupo MHB: somente pacientes com diagnóstico clínico e/ou laboratorial de Hanseníase dimorfa (*borderline*) e não classificados ou inseridos nas faixas Virchowiana ou Tuberculóide da Hanseníase;
- Grupo D: pacientes com suspeita clínica de Hanseníase e diagnósticos clínico e/ou laboratorial de dermatite inespecífica, comprovadamente não associados ou não relacionados à Hanseníase (Grupo Controle).

4.3 - Critérios de seleção, inclusão e exclusão

Foram selecionados blocos de parafina de pacientes com diagnóstico de hanseníase, no período de 2000 a 2015, que estavam armazenados no laboratório de Dermatopatologia do Anexo de Dermatologia Osvaldo Costa do Hospital das Clínicas da UFMG da UFMG.

Foram incluídas as amostras que preencheram os seguintes critérios:

- a) Idade superior a 18 e inferior a 75 anos;
- b) Amostra com tamanho superior a 3 mm de diâmetro.

Foram excluídas as amostras que preencheram o seguinte critério:

- a) pacientes imunocomprometidos ou com diagnóstico de infecção por HIV/AIDS, tuberculose ou doenças auto-imune.

4.4 - Imuno-histoquímica

Lâminas histológicas contendo cortes seriados de 5 µm das amostras parafinadas foram incubadas overnight, a 56°C, em estufa. Posteriormente, as amostras foram submetidas a etapas de desparafinação e reidratação, com três lavagens em xilol, por cinco minutos cada, e três lavagens em álcool etílico (PA), por cinco minutos. Após a reidratação, foi realizada a recuperação antigênica induzida pelo calor, em solução de citrato de sódio a 0,01 M (pH 6,0) a 90°C por 20 minutos no vapor e resfriadas a temperatura ambiente por 20 minutos. A

peroxidase endógena dos tecidos e as proteínas inespecíficas foram bloqueadas nas diferentes etapas. A marcação para imuno-histoquímica foi feita separadamente com os seguintes anticorpos primários: anti-NLRP3 (Cryopyrin-H-66: sc-66846, Santa Cruz Biotechnology, INC), anti-CASP1 (Caspase-1-14F468: sc-56036, Santa Cruz Biotechnology, INC); anti-CASP4/5 (Caspase-11 p20-A2: sc-374615, Santa Cruz Biotechnology, INC); anti-IL18 (IL 18-H173: sc-7954, Santa Cruz Biotechnology, INC); anti-IL1 (IL 6-1: sc-130326, Santa Cruz Biotechnology, INC); e anti-IL1 β (IL 1 β -2H12: sc-130323, Santa Cruz Biotechnology, INC). Vários testes, com amostras de pele doadas pelo Laboratório de Patologia Molecular, foram realizados para padronização dos anticorpos primários. Foram definidas as diluições de 1:500 para os anticorpos primários anti-NLRP3, anti-CASP1 e anti-IL β ; 1:300 para os anticorpos primários anti-CASP4/5 e anti-IL18; e 1:600 para o anticorpo primário anti-IL6. Para detecção dos anticorpos primários, foi utilizado o kit NovoLink Max Polymer Detection Novocastra TM (Leica Microsystems). Os cortes foram incubados com o sistema universal de detecção por polímeros do kit NovoLink por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L da solução reveladora fornecida pelo kit contendo o cromógeno diamino-benzidina 3,3 (DAB) e a reação incubada a temperatura ambiente por cinco minutos. A contra coloração foi realizada mergulhando as lâminas em solução de hematoxilina de Harris (Cód. 248, Vetec) por 30 segundo. As lâminas foram analisadas utilizando-se o microscópio óptico Olympus BX. As análises qualitativa e semi-quantitativa foram realizadas em campos em aumento do microscópio (40x) em áreas aleatórias e adequadas à interpretação dos dois observadores. As classificações finais foram obtidas por consenso entre os dois observadores, que examinaram os mesmos cortes histológicos e classificaram, nas áreas com maior imunorreatividade, a intensidade das reações.

Para controle e monitoramento da qualidade das reações imuno-histoquímicas, foram utilizados controles externo e interno (intralâmina). O controle externo utilizou cinco amostras pele saudável, provenientes de mamoplastia. O controle interno utilizou o próprio compartimento epitelial das amostras.

Para as análises qualitativas, foram classificadas, para cada anticorpo primário ou biomarcador, a intensidade e o percentual da imunorreatividade celular da marcação imuno-histoquímica do epitélio (EP), do infiltrado inflamatório (II) e do endotélio (EN), de acordo com os seguintes parâmetros da FIGURA 5 abaixo:

INTENSIDADE		PERCENTUAL	
0	ausente	0	ausente
1	leve ou uma cruz (+)	1	menor que 25%
2	moderada ou duas cruces (++)	2	menor que 50%
3	intensa ou três cruces (+++)	3	menor que 75%
		4	menor que 100%

FIGURA 5- Parâmetros para análise qualitativa da reatividade imuno-histoquímica.

Para as análises semi-quantitativas, foi estabelecido um escore da expressão imuno-histoquímica, de acordo com Takano e colaboradores (2016). Foram categorizadas, para cada anticorpo primário ou biomarcador, a multiplicação dos parâmetros intensidade e percentual da imunorreatividade celular da marcação imuno-histoquímica do EP, II e EN em “expressão elevada” (1) ou “expressão baixa” (0). De acordo com esses critérios (FIGURA 6), produto maior ou igual a 4 (destaque vermelho) foi considerado “expressão elevada” e produto menor ou igual a 3 (destaque azul) foi considerado “expressão baixa”.

INTENSIDADE	PERCENTUAL				
	0	1	2	3	4
0	0	0	0	0	0
1	0	1	2	3	4
2	0	2	4	6	8
3	0	3	6	9	12

FIGURA 6- Parâmetros para análise semi-quantitativa da imuno-histoquímica.

4.5 - Análises estatísticas

Os resultados obtidos foram armazenados em planilhas eletrônicas usando o programa EXCEL e submetidos à análise através dos programas R (versão 3.1.2) e MINITAB 17 (versão 17). Para análises descritivas, as variáveis categóricas das abordagens qualitativa e semi-quantitativa foram apresentadas como números e porcentagens. Para análise comparativa da diferença entre os grupos, utilizou-se o teste t de Student. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0.05$.

5 - RESULTADOS

RESULTADOS

A amostra total do estudo foi composta por 99 biópsias de pele de pacientes oriundos do Ambulatório de Hanseníase do Anexo de Dermatologia Osvaldo Costa do Hospital das Clínicas da UFMG, no período de 2000 a 2015. Os casos foram predominantemente do sexo masculino (58,33% do total), em comparação aos casos do sexo feminino (41,67% do total), com idade média de 50 anos.

Considerando os aspectos clínicos, imunopatológicos e operacionais da hanseníase previamente delineados, essa amostra total (n = 99) resultou na seguinte subdivisão: Grupo MHV: n = 39 (39,39%); Grupo MHT: n = 31 (31,31%); Grupo MHB: n = 11 (11,11%); e Grupo D: n = 18 (18,18%). A FIGURA 7 abaixo ilustra a divisão em grupos da amostra do estudo.

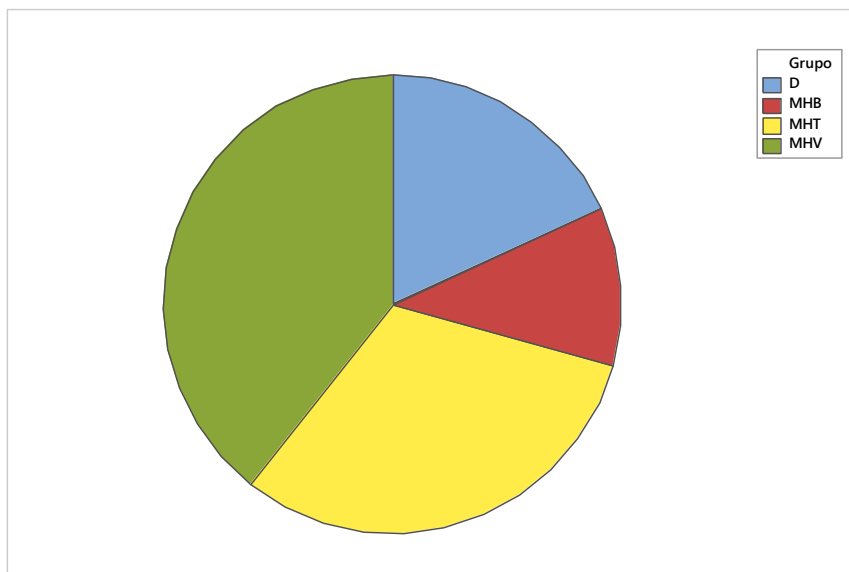


FIGURA 7 – Grupos comparativos do estudo. MHV - (cor verde): 39,39%; MHT (cor amarela): 31,31%; D (cor azul): 18,18%; MHB (cor vermelha): 11,11%.

Destaca-se o predomínio de amostras nos grupos MHT e MHV, que representam as formas polares da hanseníase, seguido pelo quantitativo do grupo D, das amostras com diagnóstico de dermatite não relacionada à hanseníase. Por último, o total de amostras do grupo MHB, que representa a forma interpolar ou forma dimorfa.

Em seguida à classificação das amostras nos grupos do estudo, foram realizadas as análises qualitativa e semi-quantitativa da imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, Caspase-1, Caspases 4/5, IL1 β , IL6 e IL18 em todas as amostras de todos os grupos. Os resultados dessas análises imuno-histoquímicas serão descritos a seguir, para cada biomarcador, de acordo com as orientações detalhadas abaixo.

Primeiramente, serão apresentadas figuras ilustrativas dos resultados obtidos nas reações de imuno-histoquímica, destacando, para cada grupo do estudo, os detalhes da imunorreatividade no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio.

Em seguida, serão apresentadas tabelas com a classificação da intensidade da imunorreatividade em todos os compartimentos ou locais (epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio) das biópsias de pele, por grupos do estudo. Em cada nível de intensidade, serão descritos o número de amostras (n), o percentual desse n em relação aos demais grupos (% linha) e o percentual desse n em relação aos outros níveis do mesmo local (% coluna). Nas tabelas, também serão apresentados os dados faltantes (*Missing*) decorrentes de perdas não previstas no decorrer do estudo.

Posteriormente, serão apresentados gráficos de barras com os percentuais de imunorreatividade de cada biomarcador nos compartimentos epitelial, inflamatório e endotelial das amostras de pele. Tanto a tabela com a classificação da intensidade, quanto o gráfico de barras do percentual de células marcadas se referem às categorias demonstradas previamente na FIGURA 5 (Vide Página 39).

Por último e em tópico separado, para finalidade de comparação dos biomarcadores entre os grupos do estudo, serão apresentados, em tabelas, os resultados dos escores da expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores, categorizados em expressão elevada ou forte (1) e baixa (0), conforme previsto na FIGURA 6 (Vide Página 39).

Porém, antes da descrição dos resultados dos biomarcadores alvo do estudo, os achados das reações imuno-histoquímicas nas amostras do controle externo de qualidade serão sintetizados na TABELA 1 abaixo, que apresenta, para cada local ou compartimento da pele selecionado, o nível ou categoria das variáveis intensidade e percentual de imunorreatividade.

TABELA 1 – Intensidade e percentual da imunorreatividade dos biomarcadores NLRP3, Caspases 1 e 4/5 e Interleucinas 1 β , 6 e 18 nas amostras do controle externo

LOCAL	VARIÁVEL	NÍVEL	NLRP3	Caspase 1	Caspases 4/5	IL1 β	IL6	IL18	
			n %	n %	n %	n %	n %	n %	
Epitélio	Intensidade	1	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	
		1	5 100	5 100	0 0	5 100	0 0	5 100	
	Percentual	2	0 0	0 0	5 100	0 0	5 100	0 0	
		0	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	
	Infiltrado inflamatório	Intensidade	0	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100
			0	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100	5 100
Endotélio	Intensidade	0	5 100	5 100	5 100	5 100	0 0	5 100	
		1	0 0	0 0	0 0	0 0	5 100	0 0	
	Percentual	0	5 100	5 100	5 100	5 100	0 0	5 100	
		1	0 0	0 0	0 0	0 0	5 100	0 0	

Nas referidas amostras do controle externo de qualidade das reações imunohistoquímicas, todos os biomarcadores demonstraram leve intensidade epitelial de imunorreatividade. Topograficamente, essa leve intensidade estava restrita à camada basal do epitélio nos biomarcadores NLRP3, Caspase-1, IL1 β e IL18, e atingiu dois terços do epitélio nos biomarcadores Caspases 4/5 e IL6.

Em relação ao infiltrado inflamatório, nenhuma amostra apresentou reatividade para os marcadores selecionados. No endotélio, somente a IL6 apresentou leve intensidade de imunorreatividade em cerca de 25% das células endoteliais presentes nas amostras. Os demais biomarcadores não apresentaram reatividade endotelial.

5.1 - NLRP3

Os resultados da intensidade da imunorreatividade do biomarcador NLRP3 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV estão apresentados na FIGURA 8 e na TABELA 2 abaixo:

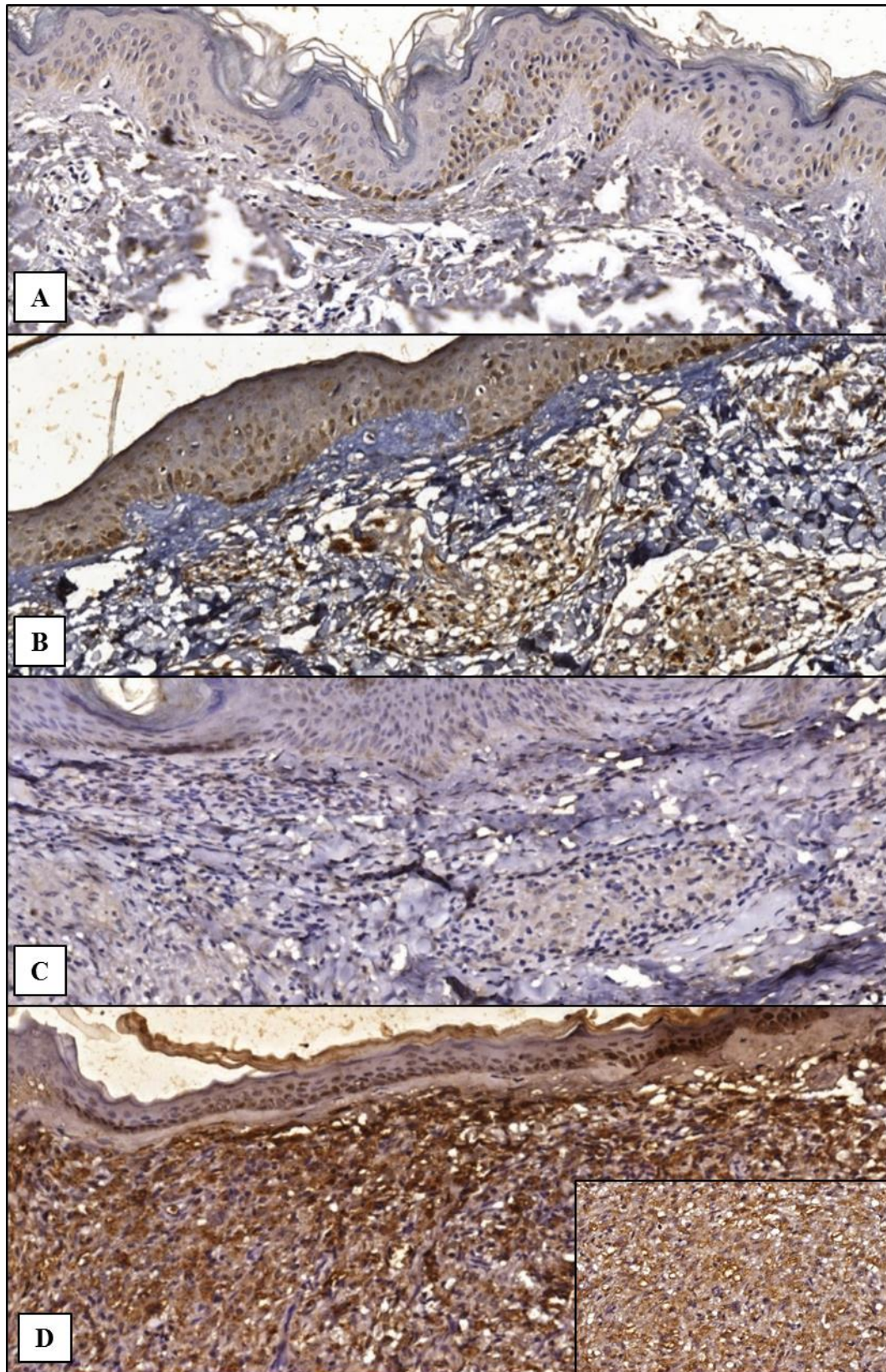


FIGURA 8 - Imunorreatividade de NLRP3 nos grupos D, MHB, MHT e MHV. A, B, C e D) Cortes histológicos de pele apresentando imunorreatividade para NLRP3 nos compartimentos epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio em amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV, respectivamente.

TABELA 2 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador NLRP3

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n	n	n	n	n
		% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna
Epitélio	0	2	0	1	0	3
		66,67	0	33,33	0	100
		11,76	0	4	0	3,26
	1	11	8	21	20	60
		18,33	13,33	35	33,33	100
		64,71	72,73	84	51,28	65,22
	2	4	3	3	17	27
		14,81	11,11	11,11	62,96	100
		23,53	27,27	12	43,59	29,35
	3	0	0	0	2	2
		0	0	0	100	100
		0	0	0	5,13	2,17
		<i>Missing</i>	1	0	6	0
Infiltrado inflamatório	0	17	1	20	1	39
		43,59	2,56	51,28	2,56	100
		100	9,09	80	2,56	42,39
	1	0	1	3	1	5
		0	20	60	20	100
		0	9,09	12	2,56	5,43
	2	0	5	1	7	13
		0	38,46	7,69	53,85	100
		0	45,45	4	17,95	14,13
	3	0	4	1	30	35
		0	11,43	2,86	85,71	100
		0	36,36	4	76,92	38,04
		<i>Missing</i>	1	0	6	0
Endotélio	0	17	5	25	14	61
		27,87	8,2	40,98	22,95	100
		100	45,45	100	35,9	66,3
	1	0	1	0	4	5
		0	20	0	80	100
		0	9,09	0	10,26	5,43
	2	0	3	0	11	14
		0	21,43	0	78,57	100
		0	27,27	0	28,21	15,22
	3	0	2	0	10	12
		0	16,67	0	83,33	100
		0	18,18	0	25,64	13,04
		<i>Missing</i>	1	0	6	0
TOTAL		17	11	25	39	92
		18,48	11,96	27,17	42,39	100
		100	100	100	100	100

De acordo com a TABELA 2 acima, os principais resultados foram os níveis de imunorreatividade de NLRP3 em todos os locais das amostras do grupo MHV. Considerando o compartimento epitelial, aproximadamente metade das amostras apresentou intensidade moderada ou intensa. Nos demais grupos, cerca de 75% das amostras exibiram epitélio com imunorreatividade com intensidade leve, similarmente à imunorreatividade de todas as amostras do controle externo. Apenas três casos (dois do grupo D e um do grupo MHT) não apresentaram imunorreatividade epitelial.

Considerando agora o infiltrado inflamatório, 76,92% das amostras do grupo MHV demonstraram intensa imunorreatividade de NLRP3. Somado ao percentual da intensidade moderada, nesse mesmo grupo, um total de aproximadamente 95% das células inflamatórias apresenta forte intensidade para esse biomarcador, resultado praticamente inverso à intensidade de NLRP3 nos grupos D e MHT, onde 100% e 80% das células inflamatórias, respectivamente, apresentaram intensidade ausente. Importante ressaltar aqui o elevado percentual de das intensidades duas (45,45%) e três (36,36%) cruzes, padrão muito próximo ao do grupo MHV.

O compartimento endotelial reproduziu boa parte dos achados da marcação das células inflamatórias. Nos grupos D e MHT, 100% das células endoteliais apresentaram intensidade ausente. No grupo MHV, cerca de 60% das amostras demonstraram moderada/intensa imunorreatividade de NLRP3. Entretanto e diferentemente das células inflamatórias, cerca de 35% não demonstraram imunorreatividade para esse biomarcador. Importante também ressaltar aqui a proximidade do padrão imunofenotípico do grupo MHT como o grupo MHV. No grupo MHT, apesar do predomínio de marcação ausente (45,45%), 27,27% e 18,18% das amostras exibiram imunorreatividade moderada e intensa, respectivamente.

Apenas para registro, todas as amostras do controle externo, como demonstrado previamente na TABELA 1 (Vide Página 43), apresentaram imunorreatividade ausente nos locais ou compartimento infiltrado inflamatório e endotélio.

Além da intensidade da reatividade imuno-histoquímica descrita acima, a avaliação do percentual de células marcadas integrou a análise qualitativa do biomarcador NLRP3. A FIGURA 9 abaixo apresenta gráfico de barras do percentual de células marcadas para NLRP3 nos compartimentos epitelial, infiltrado inflamatório e endotélio.

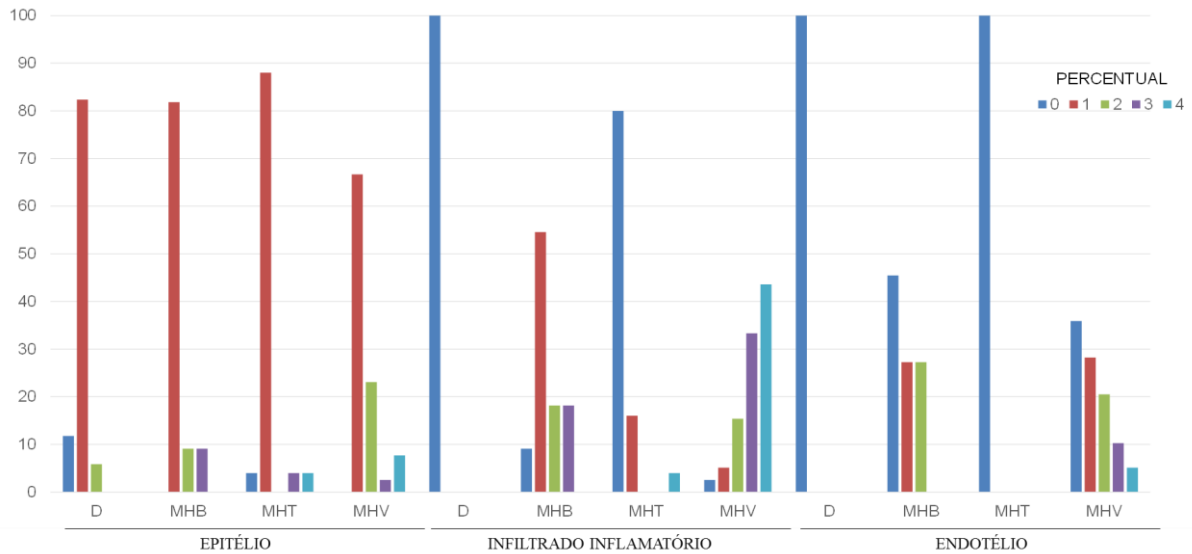


FIGURA 9 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador NLRP3

A FIGURA 9 acima destaca, no compartimento epitelial, o predomínio absoluto, em todos os grupos do estudo, da marcação imuno-histoquímica na camada basal do epitélio. Exceto por 23,08% das amostras do grupo MHV, que apresentam marcação nas células intermediárias ou camada espinhosa do epitélio, 80% ou mais das biópsias têm reatividade somente nos ceratinócitos basais. Corroborando com o controle interno de qualidade, apenas três casos (dois do grupo D e um do grupo MHT) não apresentaram imunorreatividade epitelial.

Considerando o infiltrado inflamatório, cerca de 80% das amostras do grupo MHV apresentaram reatividade celular superior a 50%. Nos grupos D e MHT, praticamente todas as amostras não apresentaram imunorreatividade celular. O percentual da reatividade celular no grupo MHB foi predominantemente basal. No endotélio, cerca de 70% das amostras de todos os grupos apresentaram percentual de reatividade celular pequeno ou inferior a 25%.

5.2 – Caspase-1

Os resultados da intensidade da imunorreatividade do biomarcador Caspase-1 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV estão apresentados na FIGURA 10 e na TABELA 3 abaixo:

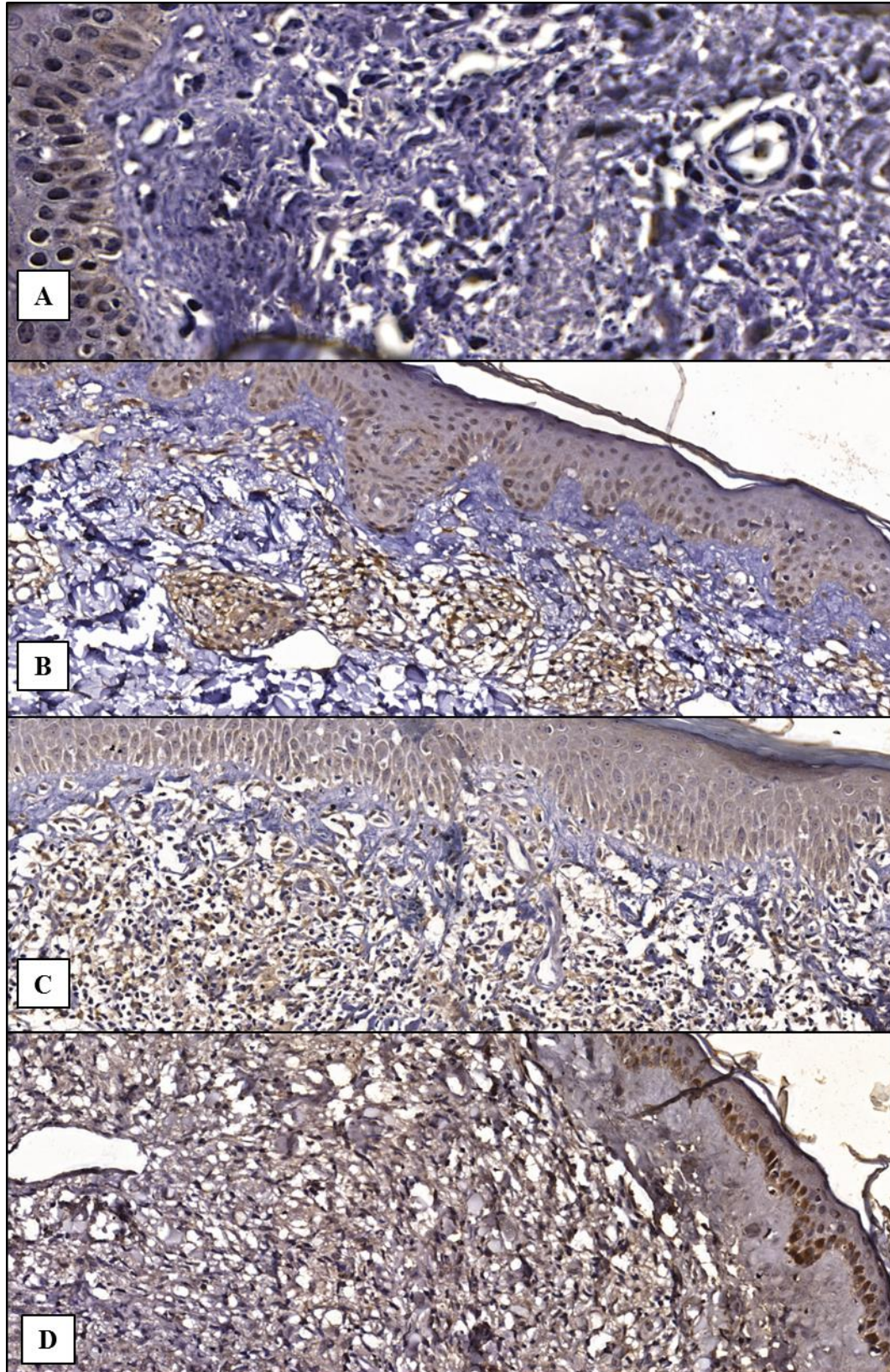


FIGURA 10 - Imunorreatividade de Caspase-1 nos grupos D, MHB, MHT e MHV. A, B, C e D) Cortes histológicos de pele apresentando imunorreatividade para Caspase-1 nos compartimentos epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio em amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV, respectivamente.

TABELA 3 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador Caspase-1

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna
Epitélio	0	2	0	2	0	4
		50	0	50	0	100
		11,76	0	7,41	0	4,44
	1	14	9	24	27	74
		18,92	12,16	32,43	36,49	100
		82,35	90	88,89	75	82,22
	2	1	1	1	7	10
		10	10	10	70	100
		5,88	10	3,7	19,44	11,11
	3	0	0	0	2	2
		0	0	0	100	100
		0	0	0	5,56	2,22
		<i>Missing</i>	1	1	4	3
Infiltrado inflamatório	0	17	9	22	21	69
		24,64	13,04	31,88	30,43	100
		100	90	81,48	58,33	76,67
	1	0	1	5	12	18
		0	5,56	27,78	66,67	100
		0	10	18,52	33,33	20
	2	0	0	0	2	2
		0	0	0	100	100
		0	0	0	5,56	2,22
	3	0	0	0	1	1
		0	0	0	100	100
		0	0	0	2,78	1,11
		<i>Missing</i>	1	1	4	3
Endotélio	0	17	9	26	34	86
		19,77	10,47	30,23	39,53	100
		100	90	96,3	94,44	95,56
	1	0	1	1	2	4
		0	25	25	50	100
		0	10	3,7	5,56	4,44
		<i>Missing</i>	1	1	4	3
TOTAL		17	10	27	36	90
		18,89	11,11	30	40	100
		100	100	100	100	100

De acordo com a TABELA 3 acima, os níveis de imunorreatividade da Caspase-1 foram muito similares em todos os locais das amostras de todos os grupos do estudo, com exceção das intensidades epitelial e nas células inflamatórias do grupo MHV. Considerando o compartimento epitelial, 75% ou mais das amostras exibiram epitélio com imunorreatividade com intensidade leve, seguido da intensidade moderada. Somente dois casos (5,56%) do grupo MHV apresentaram intensa imunorreatividade epitelial e apenas quatro casos (dois do grupo D e dois do grupo MHT) não apresentaram imunorreatividade epitelial.

No infiltrado inflamatório dos grupos D, MHB e MHT, 100%, 90% e 81,48% das células inflamatórias, respectivamente, apresentaram intensidade ausente. Embora menor (58,33%), o percentual de ausência de reatividade no grupo MHV foi expressivo, porque somente 10% das amostras desse grupo demonstraram moderada/intensa imunorreatividade de Caspase-1.

No endotélio de todos os grupos, entre 90% a 100% das amostras não apresentaram imunorreatividade para Caspase-1. Somente um pequeno percentual, não superior a 10%, das amostras dos grupos MHB, MHT e MHV apresentou imunorreatividade com intensidade fraca.

As amostras do controle externo das reações de imuno-histoquímica para o biomarcador Caspase-1 apresentaram imunorreatividade com padrões de intensidade similares às amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV. Mais detalhadamente, a intensidade da reatividade foi predominantemente leve no epitélio e totalmente ausente no infiltrado inflamatório e endotélio.

Além da intensidade da reatividade imuno-histoquímica descrita acima, a avaliação do percentual de células marcadas integrou a análise qualitativa do biomarcador Caspase-1. A FIGURA 11 abaixo apresenta gráfico de barras do percentual de células marcadas para Caspase-1 nos compartimentos epitelial, infiltrado inflamatório e endotélio.

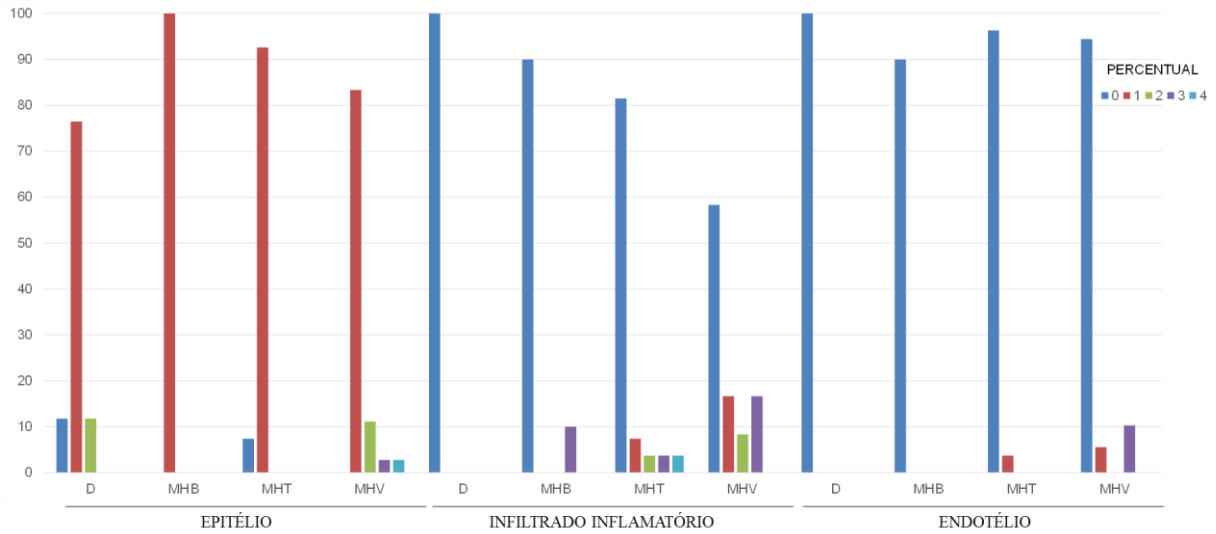


FIGURA 11 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador Caspase-1.

A FIGURA 11 acima destaca, no compartimento epitelial, o predomínio absoluto, em todos os grupos do estudo, da marcação imuno-histoquímica na camada basal do epitélio. Exceto por 11% das amostras dos grupos D e MHV, que apresentam marcação nas células intermediárias ou camada espinhosa do epitélio, 76% ou mais das biópsias têm reatividade somente nos ceratinócitos basais. Corroborando com o controle interno de qualidade, apenas quatro casos (dois do grupo D e dois do grupo MHT) não apresentaram imunorreatividade epitelial.

Considerando o infiltrado inflamatório, 80% ou mais das amostras dos grupos D, MHB e MHT, além de cerca de 60% das amostras do grupo MHV, não apresentaram reatividade celular. Nos grupos MHB, MHT e MHV, ainda foram observados menores percentuais de reatividade celular superior à categoria de 50%.

5.3 – Caspases-4/5

Os resultados da intensidade da imunorreatividade do biomarcador Caspases 4/5 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV estão apresentados na FIGURA 12 e na TABELA 4 abaixo:

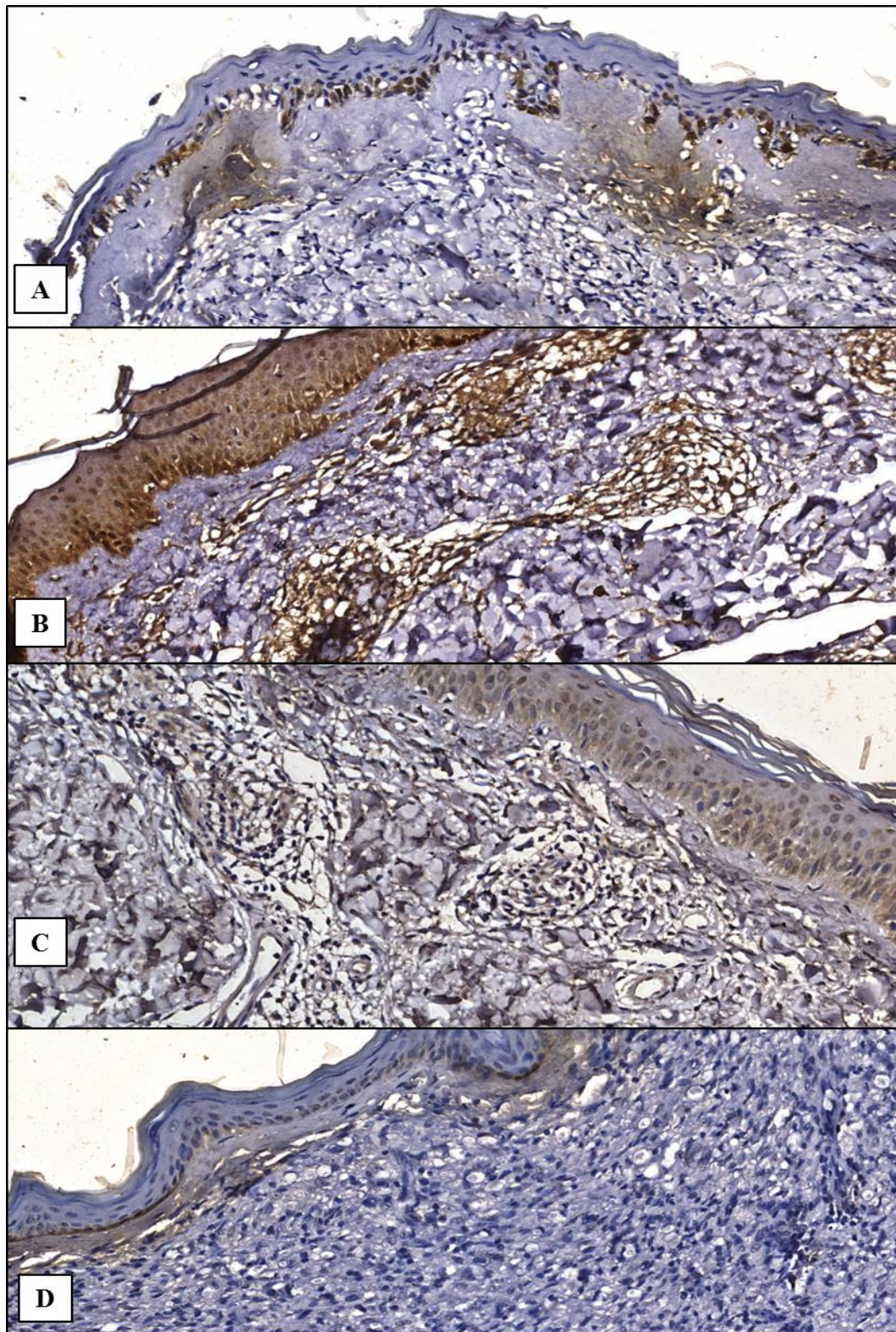


FIGURA 12 - Imunorreatividade de Caspases 4/5 nos grupos D, MHB, MHT e MHV. A, B, C e D) Cortes histológicos de pele apresentando imunorreatividade para Caspase-1 nos compartimentos epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio em amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV, respectivamente.

TABELA 4 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador Caspases 4/5

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna
Epitélio	1	10	5	19	12	46
		21,74	10,87	41,3	26,09	100
		55,56	45,45	70,37	30,77	48,42
	2	7	4	7	13	31
		22,58	12,9	22,58	41,94	100
		38,89	36,36	25,93	33,33	32,63
	3	1	2	1	14	18
		5,56	11,11	5,56	77,78	100
		5,56	18,18	3,7	35,9	18,95
	<i>Missing</i>	0	0	4	0	*
Infiltrado inflamatório	0	17	8	17	15	57
		29,82	14,04	29,82	26,32	100
		94,44	72,73	62,96	38,46	60
	1	1	0	5	3	9
		11,11	0	55,56	33,33	100
		5,56	0	18,52	7,69	9,47
	2	0	1	4	8	13
		0	7,69	30,77	61,54	100
		0	9,09	14,81	20,51	13,68
	3	0	2	1	13	16
0		12,5	6,25	81,25	100	
0		18,18	3,7	33,33	16,84	
<i>Missing</i>	0	0	4	0	*	
Endotélio	0	16	8	23	21	68
		23,53	11,76	33,82	30,88	100
		88,89	72,73	85,19	53,85	71,58
	1	2	1	2	6	11
		18,18	9,09	18,18	54,55	100
		11,11	9,09	7,41	15,38	11,58
	2	0	0	2	5	7
		0	0	28,57	71,43	100
		0	0	7,41	12,82	7,37
	3	0	2	0	7	9
0		22,22	0	77,78	100	
0		18,18	0	17,95	9,47	
<i>Missing</i>	0	0	4	0	*	
TOTAL		18	11	27	39	95
		18,95	11,58	28,42	41,05	100
		100	100	100	100	100

De acordo com a TABELA 4 acima, os principais resultados foram os níveis de imunorreatividade de Caspases-4/5 no endotélio e infiltrado inflamatório das amostras do grupo MHV. Considerando o compartimento epitelial, aproximadamente 70% das amostras apresentou intensidade moderada ou intensa. Nos demais grupos, cerca de 60% das amostras exibiram epitélio com imunorreatividade com intensidade leve, similarmente à imunorreatividade de todas as amostras do controle externo. Nenhum caso apresentou imunorreatividade epitelial ausente.

Considerando o infiltrado inflamatório, 20,51% e 33,33% das amostras do grupo MHV demonstraram, respectivamente, moderada e intensa imunorreatividade de Caspases 4/5. Nos demais grupos, a maioria absoluta das amostras apresentou intensidade ausente. Também importante ressaltar aqui o percentual das intensidades duas (9,09%) e três (18,18%) cruces nas amostras do grupo MHB, padrão relativamente próximo ao do grupo MHV.

O compartimento endotelial reproduziu boa parte dos achados da marcação das células inflamatórias. Nos grupos D e MHT, cerca de 85% das células endoteliais apresentaram intensidade ausente. No grupo MHV, 12,82% e 17,95% das amostras demonstraram, respectivamente, moderada e intensa imunorreatividade de Caspases 4/5. Entretanto, a maioria das amostras (53,85%) não demonstrou imunorreatividade para esse biomarcador. Importante ressaltar aqui a imunorreatividade endotelial com intensidade moderada em 7,41% das amostras do grupo MHT e intensa em 18,18% das amostras do grupo MHB.

Também para registro, todas as amostras do controle externo apresentaram imunorreatividade ausente nos locais ou compartimento infiltrado inflamatório e endotélio.

Além da intensidade da reatividade imuno-histoquímica descrita acima, a avaliação do percentual de células marcadas integrou a análise qualitativa do biomarcador Caspases 4/5. A FIGURA 13 abaixo apresenta gráfico de barras do percentual de células marcadas para Caspases 4/5 nos compartimentos epitelial, infiltrado inflamatório e endotélio.

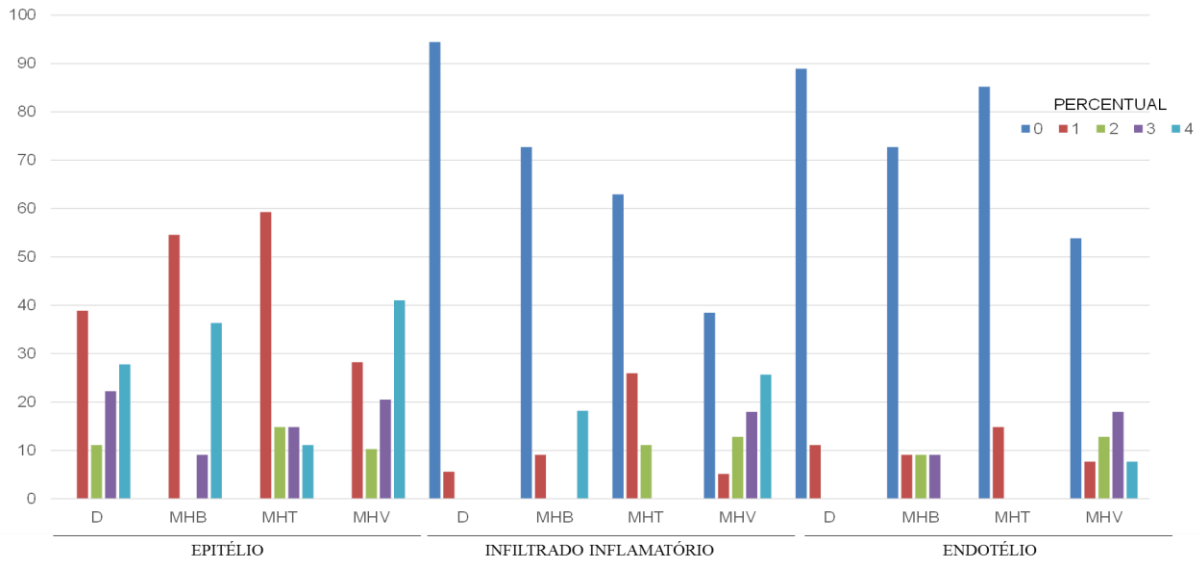


FIGURA 13 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador Caspases 4/5.

A FIGURA 13 acima destaca, no compartimento epitelial de todos os grupos do estudo, a marcação imuno-histoquímica nas camadas basal, espinhosa e granulosa do epitélio. Particularmente nas amostras do grupo MHV, foi observada marcação nas células das camadas espinhosa e granulosa do epitélio em 20,51% e 41,03% das biópsias, respectivamente.

Considerando o infiltrado inflamatório, cerca de 60% das amostras do grupo MHV apresentaram reatividade celular superior a 50%. Nos grupos D, MHB e MHT, a grande maioria das amostras não apresentou imunorreatividade nas células do infiltrado inflamatório. No endotélio, 70% ou mais das amostras dos grupos D, MHB e MHT apresentaram percentual de reatividade celular pequeno ou inferior a 25%. No grupo MHV, apesar do predomínio do percentual de reatividade celular pequeno ou inferior a 25% (53,85%), foram observadas amostras com todos os outros percentuais de reatividade celular.

5.4 - IL1 β

Os resultados da intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL1 β no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV estão apresentados na FIGURA 14 e na TABELA 5 abaixo:

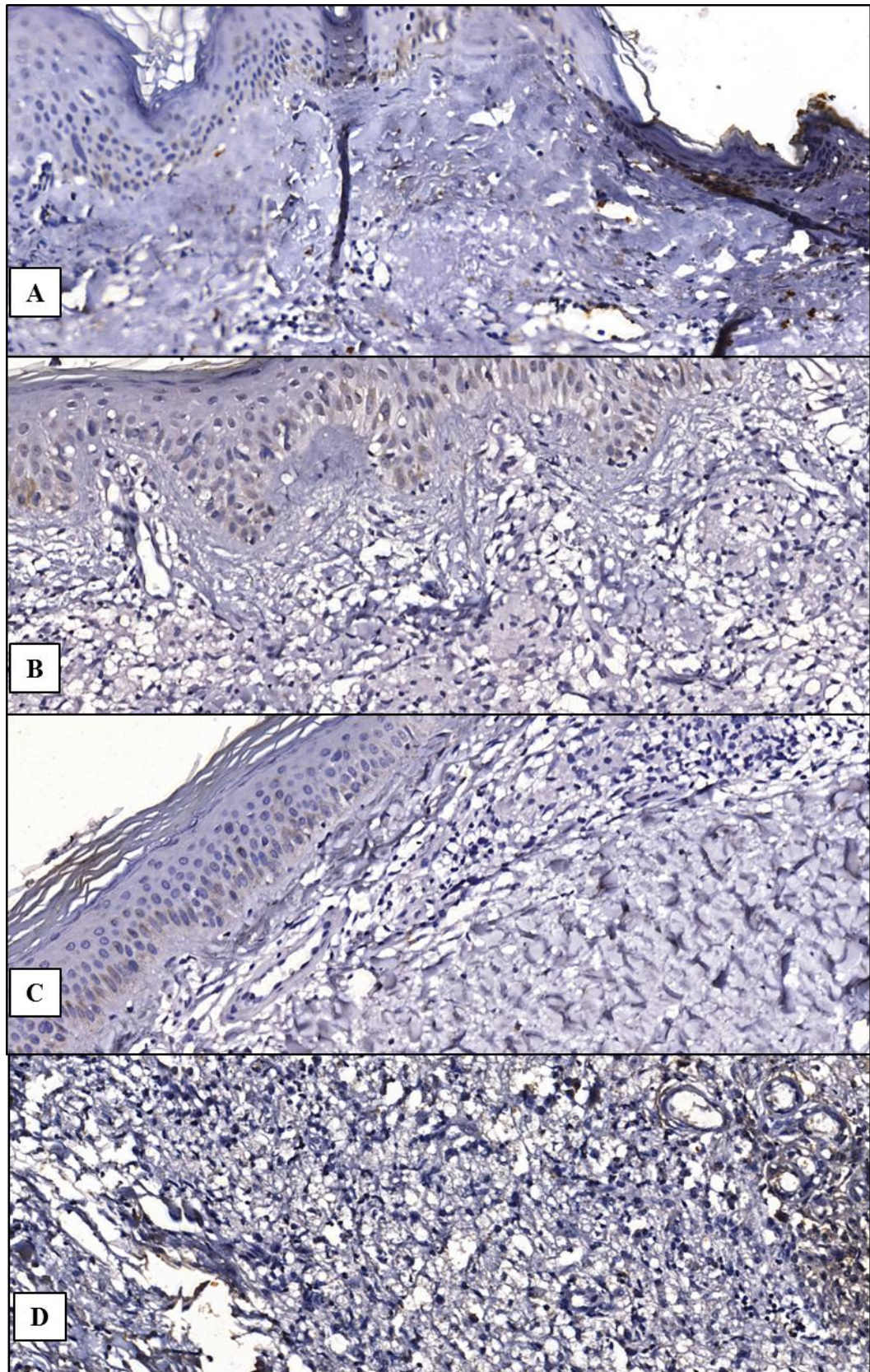


FIGURA 14 – Imunorreatividade de IL1 β nos grupos D, MHB, MHT e MHV. A, B, C e D) Cortes histológicos de pele apresentando imunorreatividade para IL1 β nos compartimentos epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio em amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV, respectivamente.

TABELA 5 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL1 β

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n	n	n	n	n
		% linha	% linha	% linha	% linha	% linha
		% coluna	% coluna	% coluna	% coluna	% coluna
Epitélio	0	0	1	2	0	3
		0	33,33	66,67	0	100
		0	11,11	7,14	0	3,53
	1	15	7	24	24	70
		21,43	10	34,29	34,29	100
		88,24	77,78	85,71	77,42	82,35
	2	2	1	2	7	12
		16,67	8,33	16,67	58,33	100
		11,76	11,11	7,14	22,58	14,12
	<i>Missing</i>	1	2	3	8	*
Infiltrado inflamatório	0	17	9	28	30	84
		20,24	10,71	33,33	35,71	100
		100	100	100	96,77	98,82
	3	0	0	0	1	1
		0	0	0	100	100
		0	0	0	3,23	1,18
	<i>Missing</i>	1	2	3	8	*
Endotélio	0	17	9	26	31	83
		20,48	10,84	31,33	37,35	100
		100	100	92,86	100	97,65
	2	0	0	1	0	1
		0	0	100	0	100
		0	0	3,57	0	1,18
	3	0	0	1	0	1
		0	0	100	0	100
		0	0	3,57	0	1,18
<i>Missing</i>	1	2	3	8	*	
TOTAL		17	9	28	31	85
		20	10,59	32,94	36,47	100
		100	100	100	100	100

De acordo com a TABELA 5 acima, os níveis de imunorreatividade da IL1 β foram muito similares em todos os locais das amostras de todos os grupos do estudo. Considerando o compartimento epitelial, cerca de 80% das amostras exibiram epitélio com imunorreatividade com intensidade leve. Somente poucos casos dos grupos D, MHB e T e sete casos (22,58%) do grupo MHV apresentaram moderada imunorreatividade epitelial. Apenas três casos (um do grupo MHB e dois do grupo MHT) não apresentaram imunorreatividade epitelial.

No infiltrado inflamatório, praticamente a totalidade das amostras, de todos os grupos, apresentaram intensidade ausente. No endotélio, exceto por dois casos do grupo MHT, praticamente todas as amostras, de todos os grupos também, apresentaram intensidade ausente ou não demonstraram imunorreatividade.

A FIGURA 15 abaixo apresenta gráfico de barras do percentual de células marcadas para IL1 β nos compartimentos epitelial, infiltrado inflamatório e endotélio.

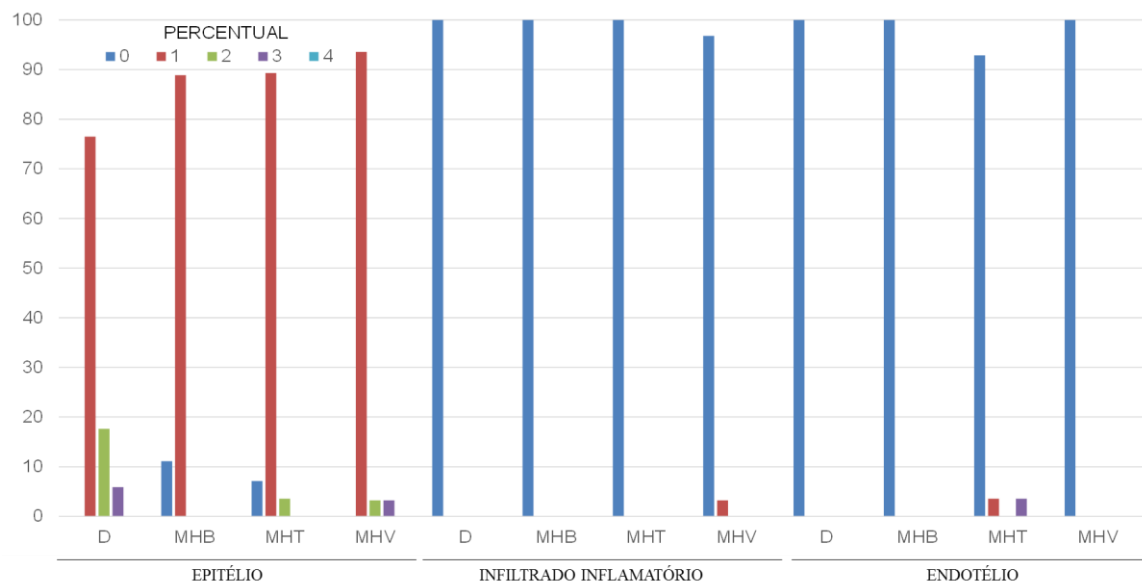


FIGURA 15 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL1 β .

A FIGURA 15 acima destaca, no compartimento epitelial, o predomínio absoluto, em todos os grupos do estudo, da marcação imuno-histoquímica na camada basal do epitélio. Destaca também a ausência de imunorreatividade para IL1 β nas células inflamatórias e no endotélio de praticamente todas as amostras.

5.5 – IL-6

Os resultados da intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL6 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV estão apresentados na FIGURA 16 e na TABELA 6 abaixo:

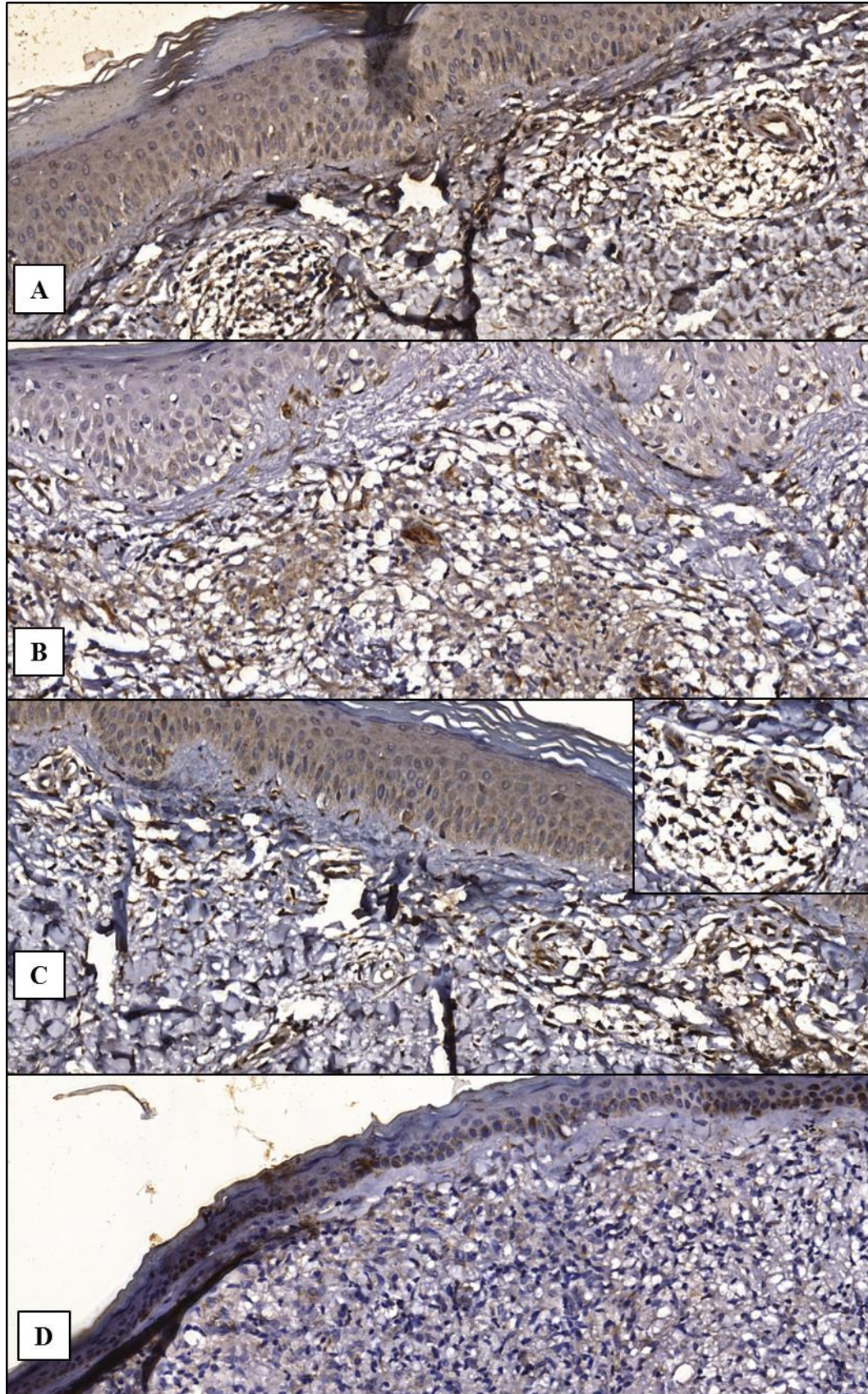


FIGURA 16 - Imunorreatividade de IL6 nos grupos D, MHB, MHT e MHV. A, B, C e D) Cortes histológicos de pele apresentando imunorreatividade para IL6 nos compartimentos epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio em amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV, respectivamente.

TABELA 6 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL6

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n	n	n	n	n
		% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna
Epitélio	1	16	8	26	24	74
		21,62	10,81	35,14	32,43	100
		88,89	80	89,66	63,16	77,89
	2	1	2	3	14	20
		5	10	15	70	100
		5,56	20	10,34	36,84	21,05
	3	1	0	0	0	1
		100	0	0	0	100
		5,56	0	0	0	1,05
	<i>Missing</i>	0	1	2	1	*
Infiltrado inflamatório	0	18	7	20	27	72
		25	9,72	27,78	37,5	100
		100	70	68,97	71,05	75,79
	1	0	2	6	7	15
		0	13,33	40	46,67	100
		0	20	20,69	18,42	15,79
	2	0	1	3	4	8
		0	12,5	37,5	50	100
		0	10	10,34	10,53	8,42
	<i>Missing</i>	0	1	2	1	*
Endotélio	0	8	1	4	9	22
		36,36	4,55	18,18	40,91	100
		44,44	10	13,79	23,68	23,16
	1	3	1	6	12	22
		13,64	4,55	27,27	54,55	100
		16,67	10	20,69	31,58	23,16
	2	5	6	8	13	32
		15,63	18,75	25	40,63	100
		27,78	60	27,59	34,21	33,68
	3	2	2	11	4	19
10,53		10,53	57,89	21,05	100	
11,11		20	37,93	10,53	20	
<i>Missing</i>	0	1	2	1	*	
TOTAL		18	10	29	38	95
		18,95	10,53	30,53	40	100
		100	100	100	100	100

De acordo com a TABELA 6 acima, os níveis de imunorreatividade da IL6 foram muito similares no epitélio e no infiltrado inflamatório das amostras de todos os grupos do estudo. Considerando o compartimento epitelial, entre 80% e 90% das amostras dos grupos D, MHB e MHT exibiram epitélio com imunorreatividade com intensidade leve. Apesar do predomínio da reatividade com leve intensidade (63,16%), o grupo MHV apresentou 36,84% das amostras com intensidade moderada. Somente dois casos (5,56%) do grupo MHV apresentaram intensa imunorreatividade epitelial e apenas quatro casos (dois do grupo D e dois do grupo MHT) não apresentaram imunorreatividade epitelial.

No infiltrado inflamatório, cerca de 70% dos grupos MHB, MHT e MHV e todas as amostras do grupo D não apresentaram reatividade. Quando reativas, as células inflamatórias dos grupos MHB, MHT e MHV exibiram intensidade leve na maioria dos casos e moderada em cerca de 10% das amostras.

No endotélio, a imunorreatividade para IL6 foi bastante heterogênea. No grupo D, a maioria das amostras (44,44%) apresentou reatividade ausente. Nos grupos MHB e MHV, 60% e 34,21% das amostras, respectivamente, exibiram moderada reatividade para IL6. No grupo MHT, a imunorreatividade endotelial para IL6 foi moderada e intensa em 27,59% e 37,93% das amostras, respectivamente. A intensidade leve foi observada em 20,69% das amostras desse último grupo e apenas quatro casos (13,79%) foram negativos para IL6.

As amostras do controle externo das reações de imuno-histoquímica para o biomarcador IL6 apresentaram imunorreatividade epitelial e nas células inflamatórias com padrões de intensidade similares às amostras dos grupos D e MHB. Mais detalhadamente, a intensidade da reatividade foi predominantemente leve no epitélio e ausente no infiltrado inflamatório. Ao nível do endotélio, sobressaíram as diferenças, principalmente nos grupos MHT e MHV.

Além da intensidade da reatividade imuno-histoquímica descrita acima, a avaliação do percentual de células marcadas integrou a análise qualitativa do biomarcador IL6. A FIGURA 17 abaixo apresenta gráfico de barras do percentual de células marcadas para IL6 nos compartimentos epitelial, infiltrado inflamatório e endotélio.

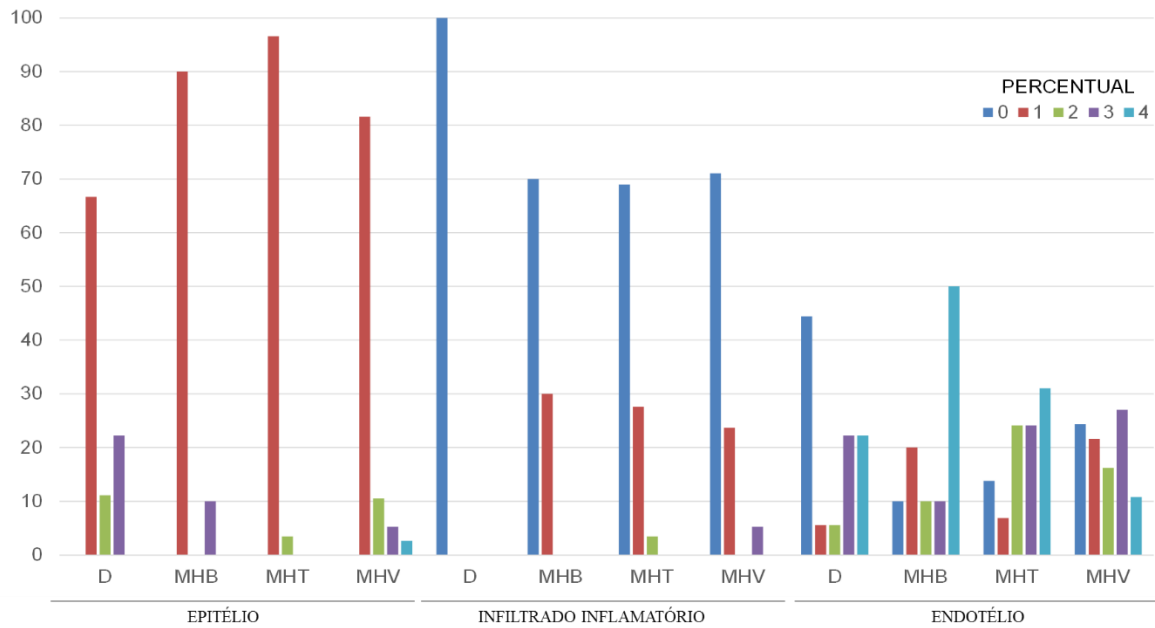


FIGURA 17 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL6.

A FIGURA 17 acima destaca, no compartimento epitelial, o predomínio absoluto, em todos os grupos do estudo, da marcação imuno-histoquímica na camada basal do epitélio. No infiltrado inflamatório, cerca de 70% das amostras dos grupos MHB, MHT e MHV não apresentam reatividade celular, e os cerca de 30% restantes demonstram reatividade em menos de 25% das células inflamatórias.

Considerando o endotélio, destacaram-se as expressivas reatividades em praticamente todos capilares, correspondente ao nível ou categoria 4 do percentual, de 50% e 31,03%, respectivamente, das amostras dos grupos MHB e MHT, além da presença do nível 3 em 27,4% das amostras do grupo MHV. Diferentemente, o único grupo com predomínio de reatividade ausente para IL6, em 44,44% das amostras, foi o grupo D.

5.6 – IL-18

Os resultados da intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL18 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV estão apresentados na FIGURA 18 e na TABELA 7 abaixo:

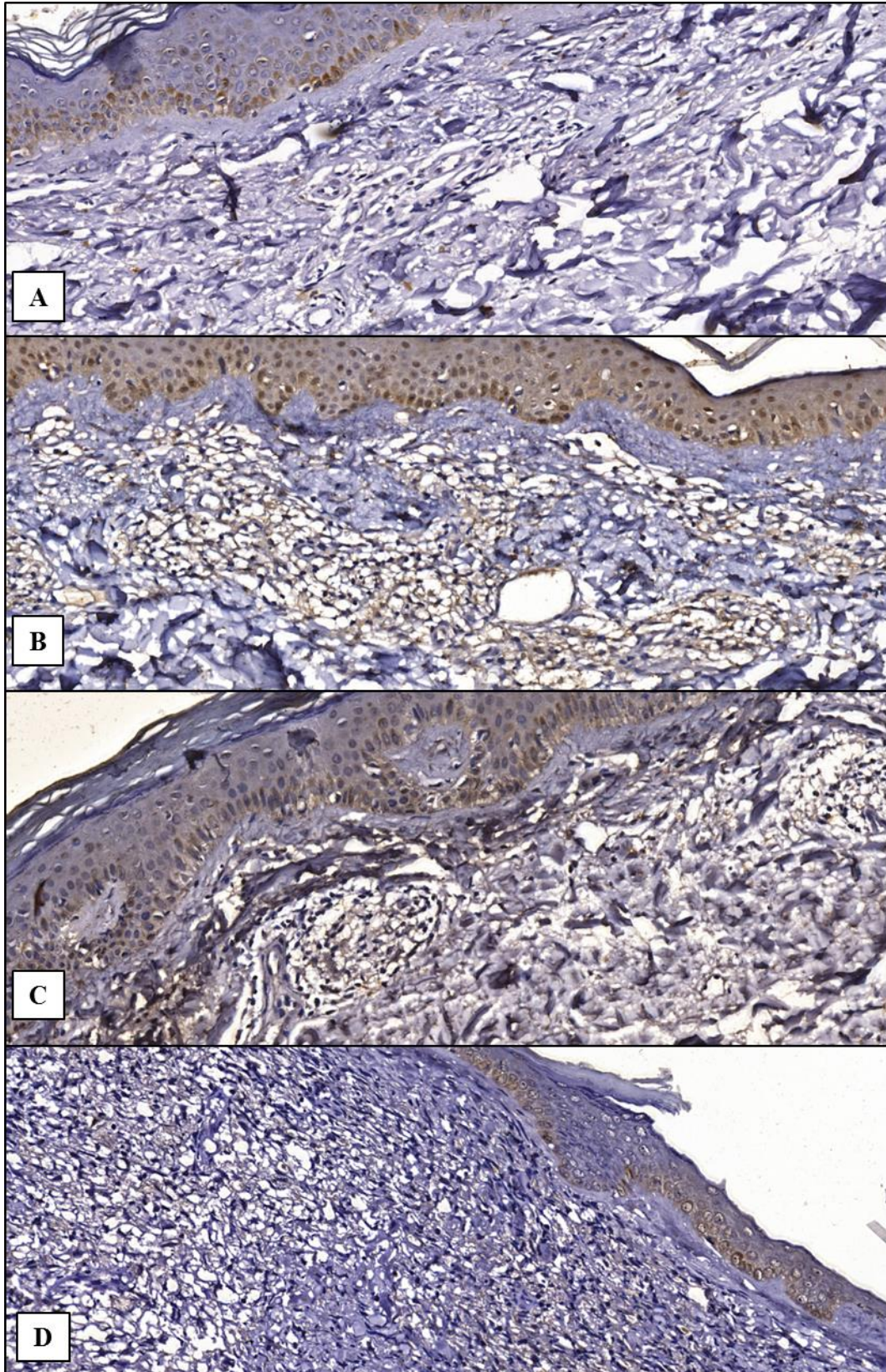


FIGURA 18 - Imunorreatividade de IL18 nos grupos D, MHB, MHT e MHV. A, B, C e D) Cortes histológicos de pele apresentando imunorreatividade para IL18 nos compartimentos epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio em amostras dos grupos D, MHB, MHT e MHV, respectivamente.

TABELA 7 - Intensidade da imunorreatividade do biomarcador IL18

LOCAL	INTENSIDADE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna
Epitélio	0	0	1	0	1	2
		0	50	0	50	100
		0	9,09	0	3,57	2,41
	1	14	8	23	17	62
		22,58	12,9	37,1	27,42	100
		82,35	72,73	85,19	60,71	74,7
	2	3	2	4	8	17
		17,65	11,76	23,53	47,06	100
		17,65	18,18	14,81	28,57	20,48
	3	0	0	0	2	2
0		0	0	100	100	
0		0	0	7,14	2,41	
	<i>Missing</i>	1	0	4	11	*
		16	8	25	23	72
Infiltrado inflamatório	0	22,22	11,11	34,72	31,94	100
		94,12	72,73	92,59	82,14	86,75
		1	2	1	3	7
	1	14,29	28,57	14,29	42,86	100
		5,88	18,18	3,7	10,71	8,43
		0	1	1	2	4
	2	0	25	25	50	100
0		9,09	3,7	7,14	4,82	
	<i>Missing</i>	1	0	4	11	*
		17	10	27	28	82
Endotélio	0	20,73	12,2	32,93	34,15	100
		100	90,91	100	100	98,8
		0	1	0	0	1
	1	0	100	0	0	100
		0	9,09	0	0	1,2
		<i>Missing</i>	1	0	4	11
		17	11	27	28	83
TOTAL		20,48	13,25	32,53	33,73	100
		100	100	100	100	100

De acordo com a TABELA 7 acima, os níveis de imunorreatividade da IL18 foram muito similares em todos os locais das amostras de todos os grupos do estudo. Considerando o compartimento epitelial, entre 70% e 80% das amostras dos grupos D, MHB e MHT e 60,71%

das amostras do grupo MHV exibiram epitélio com imunorreatividade com intensidade leve. Somente poucos casos dos grupos D, MHB e T e oito casos (28,57%) do grupo MHV apresentaram moderada imunorreatividade epitelial. Apenas dois casos (um do grupo MHB e outro do grupo MHV) não apresentaram imunorreatividade epitelial.

No infiltrado inflamatório, a grande maioria das amostras, de todos os grupos, apresentou intensidade ausente. Igualmente ao infiltrado inflamatório, no endotélio, praticamente todas as amostras de todos os grupos também apresentaram intensidade ausente ou não demonstraram imunorreatividade para IL18.

A FIGURA 19 abaixo apresenta gráfico de barras do percentual de células marcadas para IL18 nos compartimentos epitelial, infiltrado inflamatório e endotélio.

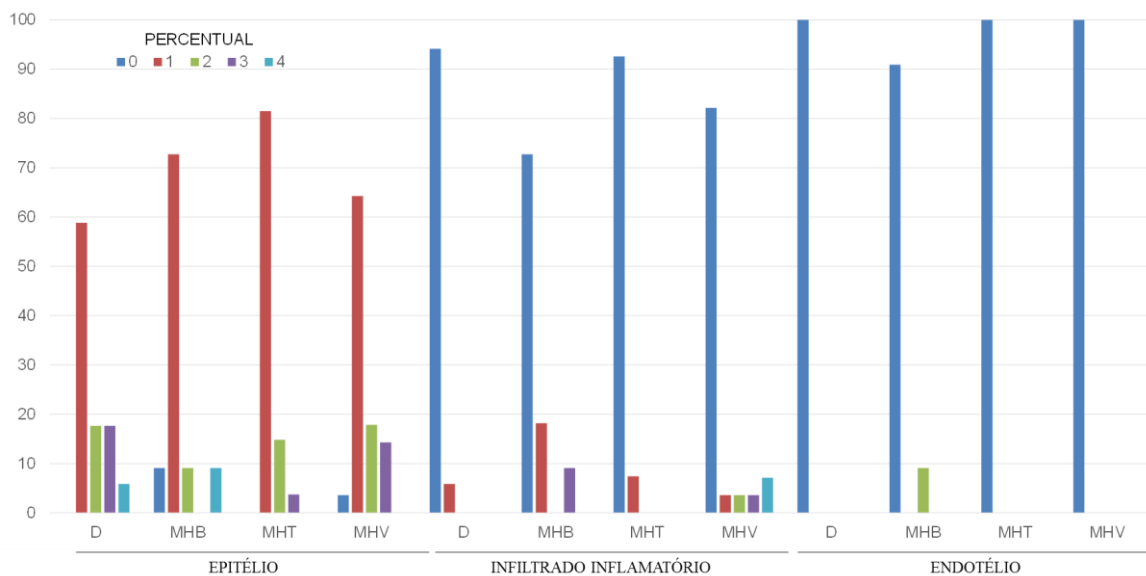


FIGURA 19 - Percentual da imunorreatividade do biomarcador IL18.

A FIGURA 19 acima destaca, no compartimento epitelial, o predomínio absoluto, em todos os grupos do estudo, da marcação imuno-histoquímica na camada basal do epitélio. Destaca também o predomínio da ausência de imunorreatividade para IL18 nas células inflamatórias e no endotélio de praticamente todas as amostras de todos os grupos do estudo.

5.7 - Escore da expressão imuno-histoquímica

Para comparação da expressão imuno-histoquímica dos biomarcadores entre os grupos do estudo, foram calculados os escores elevado ou forte (1) e baixo (0). A TABELA 8 abaixo apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador NLRP3.

TABELA 8 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador NLRP3

LOCAL	ESCORE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna
Epitélio	0	16	9	25	27	82
		19,51	10,98	30,49	32,93	100
		94,12	81,82	92,59	69,23	82,83
	1	1	2	2	12	17
		5,88	11,76	11,76	70,59	100
<i>Missing</i>	5,88	18,18	7,41	30,77	17,17	
Infiltrado inflamatório	0	1	0	4	0	*
		17	8	26	4	60
		28,33	13,33	43,33	6,67	100
	1	100	72,73	96,3	10,26	60,61
		0	3	1	35	39
<i>Missing</i>	0	7,69	2,56	89,74	100	
Endotélio	0	0	27,27	3,7	89,74	39,39
		1	0	4	0	*
		17	8	27	25	82
	1	20,73	9,76	32,93	30,49	100
		100	72,7	100	64,1	82,8
<i>Missing</i>	0	3	0	14	17	
TOTAL	0	0	17,65	0	82,35	100
		0	27,3	0	35,9	17,2
		1	0	4	0	*
	1	17	11	27	39	99
		17,17	11,11	27,27	39,39	100
<i>Missing</i>	1	0	4	0	*	
TOTAL		17	11	27	39	99
		100	100	100	100	100

De acordo com os valores da TABELA 8 acima, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo MHV e os grupos D e MHT para todos os locais.

Destacadamente, a expressão do biomarcador NLRP3 no infiltrado inflamatório das amostras do grupo MHV foi majoritariamente forte e praticamente o oposto dos grupos D e MHT ($p = 0,000$). Entre os grupos MHV e MHB, diferenças significativas apenas no infiltrado inflamatório ($p = 0,000$), porque os compartimentos epitelial e endotelial não apresentaram diferenças ($p = 0,361$ e $0,577$, respectivamente).

Para Caspase-1, a TABELA 9 abaixo apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica desse biomarcador:

TABELA 9 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador Caspase-1

LOCAL	ESCORE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna
Epitélio	0	16	10	27	34	92
		17,39	10,87	29,35	36,96	100
		94,12	100	100	94,44	96,84
	1	1	0	0	2	3
		33,33	0	0	66,67	100
<i>Missing</i>	5,88	0	0	5,56	3,16	
Infiltrado inflamatório	0	1	1	4	3	*
		17	10	26	33	91
		18,68	10,99	28,57	36,26	100
	1	100	100	96,3	91,67	95,79
		0	0	1	3	4
<i>Missing</i>	0	0	25	75	100	
Endotélio	0	0	0	3,7	8,33	4,21
		1	1	4	3	*
		17	10	27	36	95
	1	17,89	10,53	28,42	37,89	100
		100	100	100	100	100
<i>Missing</i>	1	1	4	3	*	
TOTAL	0	17	10	27	36	95
		17,89	10,53	28,42	37,89	100
		100	100	100	100	100

De acordo com os valores da TABELA WW acima, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos D, MHB, MHT e MHV após comparação da

expressão de Caspase-1 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras examinadas. Ou seja, todos os grupos apresentaram o mesmo padrão imuno-histoquímico ou expressão fraca de Caspase-1 nos compartimentos epitelial, celular inflamatório e endotelial.

Para Caspases 4/5, a TABELA 10 abaixo apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica desse biomarcador:

TABELA 10 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador Caspases 4/5

LOCAL	ESCORE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n	n	n	n	n
		% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna
Epitélio	0	11	6	20	14	56
		19,64	10,71	35,71	25	100
		61,11	54,55	74,07	35,9	56
	1	7	5	7	25	44
		15,91	11,36	15,91	56,82	100
		38,89	45,45	25,93	64,1	44
<i>Missing</i>	0	0	4	0	*	
Infiltrado inflamatório	0	18	9	25	18	75
		24	12	33,33	24	100
		100	81,82	92,59	46,15	75
	1	0	2	2	21	25
		0	8	8	84	100
		0	18,18	7,41	53,85	25
<i>Missing</i>	0	0	4	0	*	
Endotélio	0	18	9	27	27	86
		20,93	10,47	31,4	31,4	100
		100	81,8	100	69,2	86
	1	0	2	0	12	14
		0	14,29	0	85,71	100
		0	18,2	0	30,8	14
<i>Missing</i>	0	0	4	0	*	
TOTAL		18	11	27	39	100
		18	11	27	39	100
		100	100	100	100	100

De acordo com os valores da TABELA 10 acima, foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o grupo MHV e o grupos D, MHB e MHT na expressão de

Caspases 4/5 no infiltrado inflamatório ($p = 0,000$). Destacadamente, a expressão do biomarcador Caspases 4/5 no infiltrado inflamatório das amostras do grupo MHV foi majoritariamente forte e praticamente o oposto dos grupos D, MHB e MHT. Em relação ao epitélio, diferenças significativas apenas entre os grupos MHV e MHT ($P = 0,001$). No endotélio, também foram observadas diferenças significativas do grupo MHV com os grupos D e MHT ($P = 0,000$).

Para IL1 β , a TABELA 11 abaixo apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica desse biomarcador:

TABELA 11 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador IL1 β

LOCAL	ESCORE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n	n	n	n	n
		% linha	% linha	% linha	% linha	% linha
		% coluna	% coluna	% coluna	% coluna	% coluna
Epitélio	0	17	9	28	29	88
		19,32	10,23	31,82	32,95	100
		100	100	100	93,5	97,8
	1	0	0	0	2	2
		0	0	0	100	100
		0	0	0	6,5	2,2
<i>Missing</i>	1	2	3	8	*	
Infiltrado inflamatório	0	17	9	28	31	90
		18,89	10	31,11	34,44	100
		100	100	100	100	100
	<i>Missing</i>	1	2	3	8	*
Endotélio	0	17	9	27	31	89
		19,1	10,11	30,34	34,83	100
		100	100	96,4	100	98,9
	1	0	0	1	0	1
		0	0	100	0	100
		0	0	3,6	0	1,1
<i>Missing</i>	1	2	3	8	*	
TOTAL		17	9	28	31	90
		18,89	10	31,11	34,44	100
		100	100	100	100	100

De acordo com os valores da TABELA 11 acima, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos D, MHB, MHT e MHV após comparação da

expressão de IL1 β no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras examinadas. Ou seja, todos os grupos apresentaram o mesmo padrão imuno-histoquímico ou expressão fraca de IL1 β nos compartimentos epitelial, celular inflamatório e endotelial.

Para IL6, a TABELA 12 abaixo apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica desse biomarcador:

TABELA 12 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador IL6

LOCAL	ESCORE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n	n	n	n	n
		% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna	% linha % coluna
Epitélio	0	17	10	28	33	93
		18,28	10,75	30,11	35,48	100
		94,44	100	96,55	86,84	93
	1	1	0	1	5	7
		14,29	0	14,29	71,43	100
		5,56	0	3,45	13,16	7
<i>Missing</i>	0	1	2	1	*	
Infiltrado inflamatório	0	18	10	28	37	98
		18,37	10,2	28,57	37,76	100
		100	100	96,55	97,37	98
	1	0	0	1	1	2
		0	0	50	50	100
		0	0	3,45	2,63	2
<i>Missing</i>	0	1	2	1	*	
Endotélio	0	11	3	10	24	53
		20,75	5,66	18,87	45,28	100
		61,11	30	34,48	63,16	53
	1	7	7	19	14	47
		14,89	14,89	40,43	29,79	100
		38,89	70	65,52	36,84	47
<i>Missing</i>	0	1	2	1	*	
TOTAL		18	10	29	38	100
		18	10	29	38	100
		100	100	100	100	100

De acordo com os valores da TABELA 12 acima, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos D, MHB, MHT e MHV após comparação da

expressão de IL6 no epitélio e infiltrado inflamatório e endotélio das amostras examinadas. Entretanto, no compartimento endotelial, observou-se predominância de forte expressão de IL6 nos grupos MHB e MHT, com diferenças significativas entre esses grupos e os grupos D e MHV ($p < 0,05$).

Para IL18, a TABELA 13 abaixo apresenta os escores da expressão imuno-histoquímica desse biomarcador:

TABELA 13 – Escores da expressão imuno-histoquímica do biomarcador IL18

LOCAL	ESCORE	GRUPO				
		D	MHB	MHT	MHV	TOTAL
		n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna	n % linha % coluna
Epitélio	0	15	10	27	22	79
		18,99	12,66	34,18	27,85	100
		88,24	90,91	96,43	78,57	88,76
	1	2	1	1	6	10
		20	10	10	60	100
<i>Missing</i>	11,76	9,09	3,57	21,43	11,24	
	<i>Missing</i>	1	0	3	11	*
Infiltrado inflamatório	0	17	11	28	24	85
		20	12,94	32,94	28,24	100
		100	100	100	85,7	95,5
	1	0	0	0	4	4
		0	0	0	100	100
<i>Missing</i>	0	0	0	14,3	4,5	
	<i>Missing</i>	1	0	3	11	*
Endotélio	0	17	11	28	28	89
		19,1	12,36	31,46	31,46	100
	<i>Missing</i>	100	100	100	100	100
	<i>Missing</i>	1	0	3	11	*
		17	11	28	28	89
	TOTAL	19,1	12,36	31,46	31,46	100
		100	100	100	100	100

De acordo com os valores da TABELA 13 acima, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos D, MHB, MHT e MHV após comparação da expressão de IL18 no epitélio, infiltrado inflamatório e endotélio das amostras examinadas. Ou

seja, todos os grupos apresentaram o mesmo padrão imuno-histoquímico ou expressão fraca de IL18 nos compartimentos epitelial, celular inflamatório e endotelial.

Resumidamente, todas as comparações entre os grupos D, MHB, MHT e MHV para os biomarcadores NLRP3, caspases 1 e 4/5 e interleucinas 1 β , 6 e 18 estão demonstradas na FIGURA 20 abaixo:

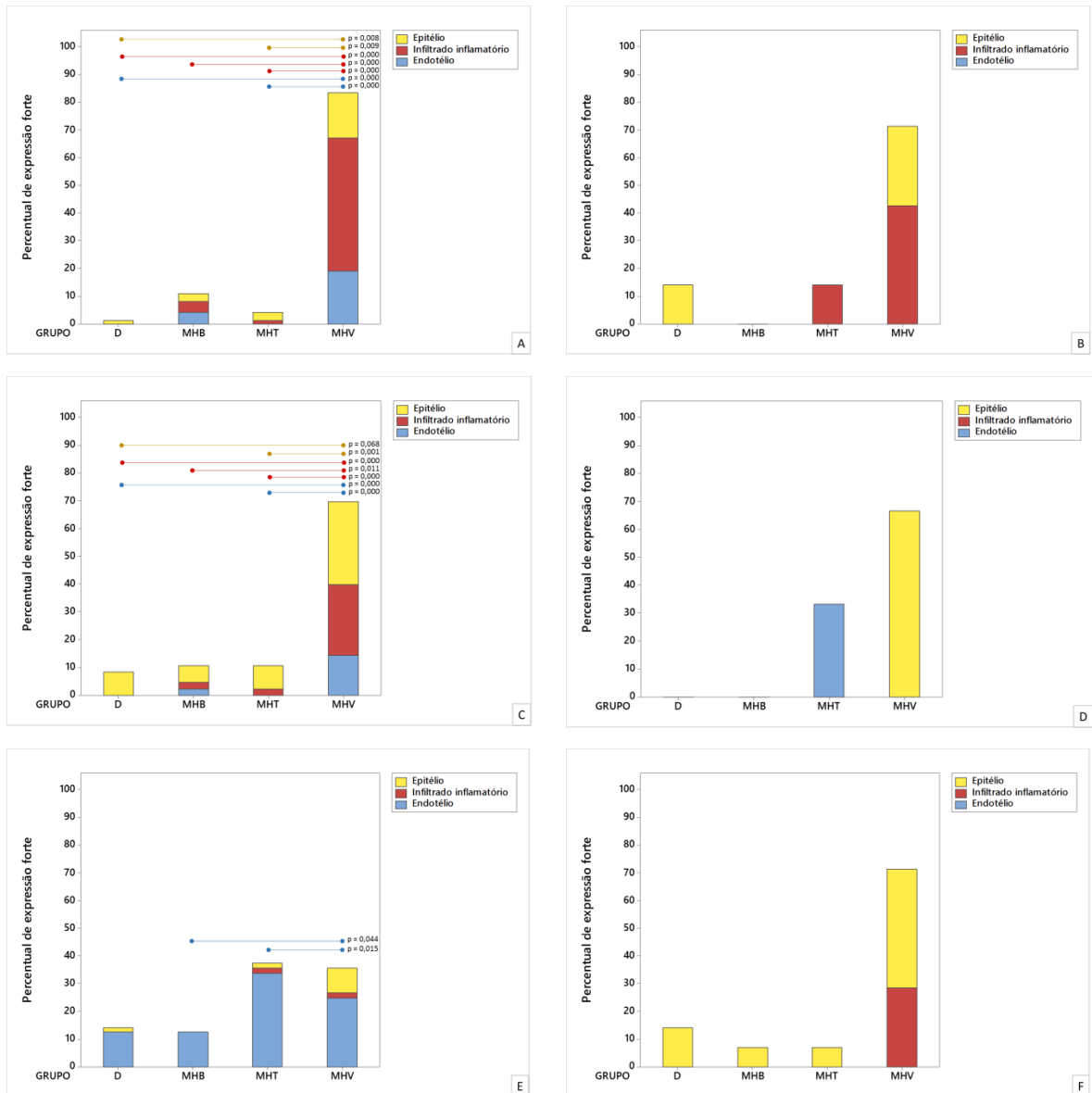


FIGURA 20 – Gráficos de barras da expressão forte (Escore 1) dos biomarcadores NLRP3, caspases 1 e 4/5 e interleucinas 1 β , 6 e 18. A) NLRP3; B) Caspase-1; C) Caspases 4/5; D) IL1 β ; E) IL6; F) IL18. As diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre os grupos foram destacadas para cada local ou compartimento cutâneo.

Destacadamente, os gráficos de barra da FIGURA 20 acima demonstram a superexpressão dos biomarcadores NLRP3 e Caspases 4/5 nas amostras do grupo MHV, que representa o polo virchowiano ou lepromatoso da hanseníase, micro e imunopatologicamente caracterizado pela grande quantidade do bacilo *Mycobacterium leprae* e por uma resposta inflamatória com baixos níveis de INF γ , em relação aos grupos MHT, que representa o polo tuberculóide da hanseníase, e D, que representa inflamação ou dermatite inespecífica, sem causa microbiológica determinada. Não foram observadas diferenças significativas nas expressões epitelial e endotelial dos biomarcadores NLRP3 e Caspases 4/5 entre os grupos MHV e MHB.

Os gráficos destacam também a ausência de diferenças estatisticamente significativas nas comparações entre todos os grupos para os biomarcadores Caspase-1, IL1 β e IL18, além da diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos MHT e MHV para a expressão do biomarcador IL6 no endotélio das amostras.

Em conjunto, foram encontradas uma grande associação dos biomarcadores NLRP3 e Caspases 4/5 com o grupo MHV, uma similaridade entre os padrões de expressão dos grupos MHV e MHB para todos os biomarcadores, exceto no infiltrado inflamatório para NLRP3 e Caspases 4/5 e no endotélio para IL6, além de uma similaridade entre os padrões de expressão dos grupos MHT e D, exceto para a expressão endotelial de IL6.

6 - DISCUSSÃO

6 – DISCUSSÃO

O presente estudo apresentou resultados relevantes e originais para ampliação e aprofundamento do conhecimento acerca da participação ou não do inflamassoma na imunopatogênese da hanseníase.

Em conjunto, foram encontradas associações de hiperexpressão dos biomarcadores NLRP3 e caspases 4/5 com as formas multibacilares, particularmente a forma virchowiana, decorrente da similaridade entre os padrões de expressão dos grupos MHV e MHB nos compartimentos epitelial, infiltrado inflamatório e endotélio, além da fraca expressão dos biomarcadores caspase-1, IL1 β e IL18 tanto nas formas multibacilares, quanto nas formas paucibacilares.

Esses resultados foram detalhadamente descritos e demonstrados nas tabelas e figuras ilustrativas da expressão de cada biomarcador nos quatro grupos do estudo, bem como nas tabelas e nos gráficos dos escores da expressão desses marcadores. Especialmente nos gráficos da FIGURA 18 (Vide Página 72), foi possível observar as significativas e expressivas diferenças estatísticas entre a superexpressão dos biomarcadores NLRP3 e Caspases 4/5 nas amostras dos grupos MHV e MHB, que representam o polo virchowiano ou lepromatoso da hanseníase, micro e imunopatologicamente caracterizado pela grande quantidade do bacilo *Mycobacterium leprae* e por uma resposta inflamatória com baixos níveis de INF γ , em relação aos grupos MHT, que representa o polo tuberculóide da hanseníase, e D, que representa inflamação ou dermatite inespecífica, sem causa microbiológica determinada.

Além dessa hiperexpressão dos biomarcadores NLRP3 e Caspases 4/5 nas amostras dos grupos MHV e MHB, outro expressivo resultado, desta vez pela ausência de diferenças estatisticamente significativas, foi a fraca expressão dos biomarcadores caspase-1, IL1 β e IL18 em todos os grupos do estudo. Ou seja, independentemente da presença ou não do *Mycobacterium leprae* nos polos virchowiano e tuberculóide, respectivamente, não há hiperexpressão imunofenotípica dos biomarcadores caspase-1, IL1 β e IL18 no epitélio, nas células do infiltrado inflamatório e no endotélio da pele dos hansenianos.

Considerando que o estudo foi realizado no Laboratório de Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG, com técnica e protocolos rigorosamente padronizados, conforme orientações dos fabricantes dos insumos, e com amostras oriundas do Ambulatório de Hanseníase do Anexo de Dermatologia Osvaldo Costa do Hospital das Clínicas da UFMG,

reconhecido centro de referência técnica regional, o principal risco de viés na produção desses resultados foi a subjetividade da interpretação da imuno-histoquímica.

Para mitigar ou controlar esse risco de subjetividade, três cuidados foram adotados: 1º) análise qualitativa ou descritiva das reações de imuno-histoquímica nos locais ou compartimentos epitelial, dérmico e endotelial por duas variáveis independentes (intensidade e percentual de reatividade); 2º) análise semi-quantitativa das reações de imuno-histoquímica nos mesmos locais por meio da adoção de escore de expressão imuno-histoquímica, conforme publicação de Takano e colaboradores (2016); 3º) classificação das reações imuno-histoquímicas por meio do consenso entre dois observadores independentes.

Além das estratégias acima para reduzir a subjetividade da interpretação imuno-histoquímica, os resultados desse estudo foram criticamente comparados com outros estudos relacionados aos temas imunopatologia da hanseníase e inflamassoma.

Em relação ao inflamassoma NLRP3, evidências recentes sugerem uma participação mais evidente da família de receptores NOD-like NLRP3 na geração de um inflamassoma induzido por caspase-11 (análoga, em humanos, das caspases inflamatórias 4/5) nas respostas a infecções bacterianas, com habilidade de prontamente obter acesso ao citoplasma das células do hospedeiro, tais como os bacilos da tuberculose e da hanseníase. Porém, os estímulos inatos que ativam estas vias são ainda desconhecidos (Latz *et al.*, 2013).

Diante dessas evidências de Latz e colaboradores (2013), a forte expressão dos biomarcadores NLRP3 e Caspases 4/5 nas amostras dos grupos MHV e MHB e fraca expressão nos grupos MHT e D, seriam consequências diretas da ação do *M. leprae* na ativação do inflamassoma NLRP3 nas amostras do polo virchowiano. Esse bacilo, por se encontrar em número reduzido ou ausente no polo tuberculóide, não ativaria o inflamassoma nas amostras do grupo MHT, justificando a fraca expressão dos biomarcadores NLRP3 e caspases 4/5.

Esses mecanismos de ação do *M. leprae* e ativação do inflamassoma NLRP3 pela via não-canônica podem ser similares ao mecanismo da maioria das bactérias Gram negativo, tais como *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium* e *Vibrio cholerae*, que são constituídas pela molécula LPS. Acredita-se que o LPS tem a capacidade de se ligar e ativar diretamente a caspase-11, homóloga às caspases 4/5 dos humanos (He *et al.*, 2016). Entretanto, essa hipótese contrasta com os resultados do estudo de Master e colaboradores (2008), um dos poucos estudos

publicados que abordam essa questão. Eles sugerem redução da ativação ou do efeito do inflamassoma NLRP3 na presença do *M. tuberculosis*.

Em relação ao outro conjunto de resultados relevantes, a fraca expressão imunofenotípica dos biomarcadores caspase-1, IL1 β e IL18 no epitélio, nas células do infiltrado inflamatório e no endotélio tanto nas amostras de pele dos hansenianos (grupos MHB, MHT e MHV), quanto nas amostras de pele inflamada por causa não microbiológica (grupo D), a um número maior, apesar de ainda restrito, de pesquisas que abordaram a questão e, majoritariamente, corroboram os resultados desse estudo.

Considerando que a célula dendrítica presente na pele reconhece o *M. leprae* através dos PRR, e assim fagocita, processa e apresenta o bacilo aos linfócitos T, ocorre a secreção de citocinas moduladoras da inflamação e da resposta imune adaptativa para o tipo Th1 ou Th2. No padrão de resposta do Tipo 1 (Th1), há grande quantidade de IFN γ . No padrão de resposta do Tipo 2, trabalhos recentes mostraram evidências de que o *M. leprae* pode suprimir a ativação das células dendríticas, gerando um estado anérgico (menos reativo/ menos imunogênico), como observado nas formas interpolares e virchowiana, o que fundamenta a semelhança de padrões imuno-histoquímicos entre os grupos MHB e MHV. (Scollard *et al.*, 2006; Hashimoto *et al.*, 2002; Murray *et al.*, 2007).

Esses resultados da fraca expressão da caspase-1, IL-1 β e IL-18 também foram reforçados pelos trabalhos de Kang e colaboradores (2010), que demonstraram a redução na ativação da Caspase-1 e na secreção de IL-1 β , em macrófagos da linhagem A/J, após estímulo com o *M. leprae*, e de Sinsimer e colaboradores (2009), que encontraram uma elevada indução do antagonista do receptor de IL-1 β (IL1-Ra) e supressão da IL-6, além do detalhada pesquisa do Shah e colaboradores (2016), que propuseram um novo mecanismo do *M. leprae* para regular os TLR e a sinalização do receptor da IL-1 β (IL1-R) por meio da forte indução do IL1-Ra, com consequente inibição do inflamassoma NLRP3.

Apesar do foco no *M. Tuberculosis*, outra grande contribuição para a força dos nossos resultados foi o estudo de Mishra e colaboradores (2013). Eles elegantemente demonstraram a inibição da efetividade do inflamassoma NLRP3 por meio de uma modificação pós-transcricional (nitrosilação), o que acarretou redução na produção de IL-1 β e IFN γ . Diferentemente, Costa e colaboradores (2008) demonstraram altos níveis de IL-1 β em pacientes com hanseníase independente da forma clínica, em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo ativação da resposta imune celular.

Ou seja, exceto pela expressão forte de IL6 no endotélio das amostras do polo tuberculóide, fato que pode estar especificamente associado ao microambiente inflamatório com predomínio da resposta do Tipo 1 na pele (Fitzner *et al.*, 2011), o presente estudo identificou pouca expressão e fraca reatividade dos marcadores caspase-1, IL1 β e IL18 nas formas polares da hanseníase, sugerindo uma baixa participação destes mediadores inflamatórios neste contexto imunopatogênico.

Dessa forma e considerando os dados da literatura sobre a ativação do inflamassoma da subfamília NLRP3, que normalmente necessita de dois sinais, o primeiro para ativar a transcrição de NLRP3, IL-1 β e pró-IL-18 dependente do reconhecimento do microorganismo; e o segundo estímulo proveniente de distúrbios celulares (via clássica) ou de contato do microorganismo com as caspases-4/5, resultando na formação do inflamassoma tipo NLRP3, recrutamento da proteína adaptadora Pycard (ASC), ativação da caspase-1 e maturação da pró-IL-1 β e pró-IL-18, os seguintes mecanismos poderiam explicar todos os resultados deste estudo nas formas pauci e multibacilar da hanseníase.

Na forma paucibacilar da hanseníase, representada neste estudo pelo grupo MHT, há microambiente dérmico com padrão de resposta do Tipo 1, que é caracterizada, dentre outros, pela elevada expressão de interferons, tanto do Tipo I, como o IFN- β , quanto o IFN- γ , estimulada pela presença de fragmentos do *M. leprae*, como resíduos de ácido desoxirribonucleico (DNA). Essa grande presença de IFN- β e IFN- γ poderia inibir diretamente a transcrição dos fatores NLRP3 e pró-IL-1 β e pró-IL-18 e, conseqüentemente, se opor à ativação do inflamassoma NLRP3. Esse mecanismo pouco dependente do bacilo se aproximaria muito da resposta inflamatória na pele de etiologia não infecciosa, aqui representado pelo padrão de expressão imuno-histoquímica observado no grupo D.

Na forma multibacilar da hanseníase, representada neste estudo pelos grupos MHB e MHD, há uma grande presença de bacilos *M. leprae* nos macrófagos e microambiente dérmico com padrão de resposta do Tipo 2, com fraca ou baixa expressão de interferons, principalmente o IFN- γ . Neste caso, a grande quantidade do bacilo seria o principal fator de estimulação da transcrição dos biomarcadores NLRP3 e caspases-4/5, caracterizando perfil imunofenotípico de hiperexpressão do inflamassoma NLRP3. Entretanto, a mesma grande presença do *M. leprae* inibiria, diretamente, a expressão dos biomarcadores caspase-1, IL1 β e IL18 por prováveis ações na transcrição e/ou ativação da caspase-1. Assim, como demonstrado neste estudo pelo padrão de expressão imuno-histoquímica observado nos grupos MHB e MHV, ocorreria uma

inativação ou não participação efetiva do inflamassoma NLRP3 e a evasão imune do *M. leprae* na hanseníase.

A FIGURA 21 abaixo ilustra esses mecanismos hipotéticos de interação do inflamassoma NLRP3 com o *M. leprae* dentro da linha da imunopatologia da hanseníase.

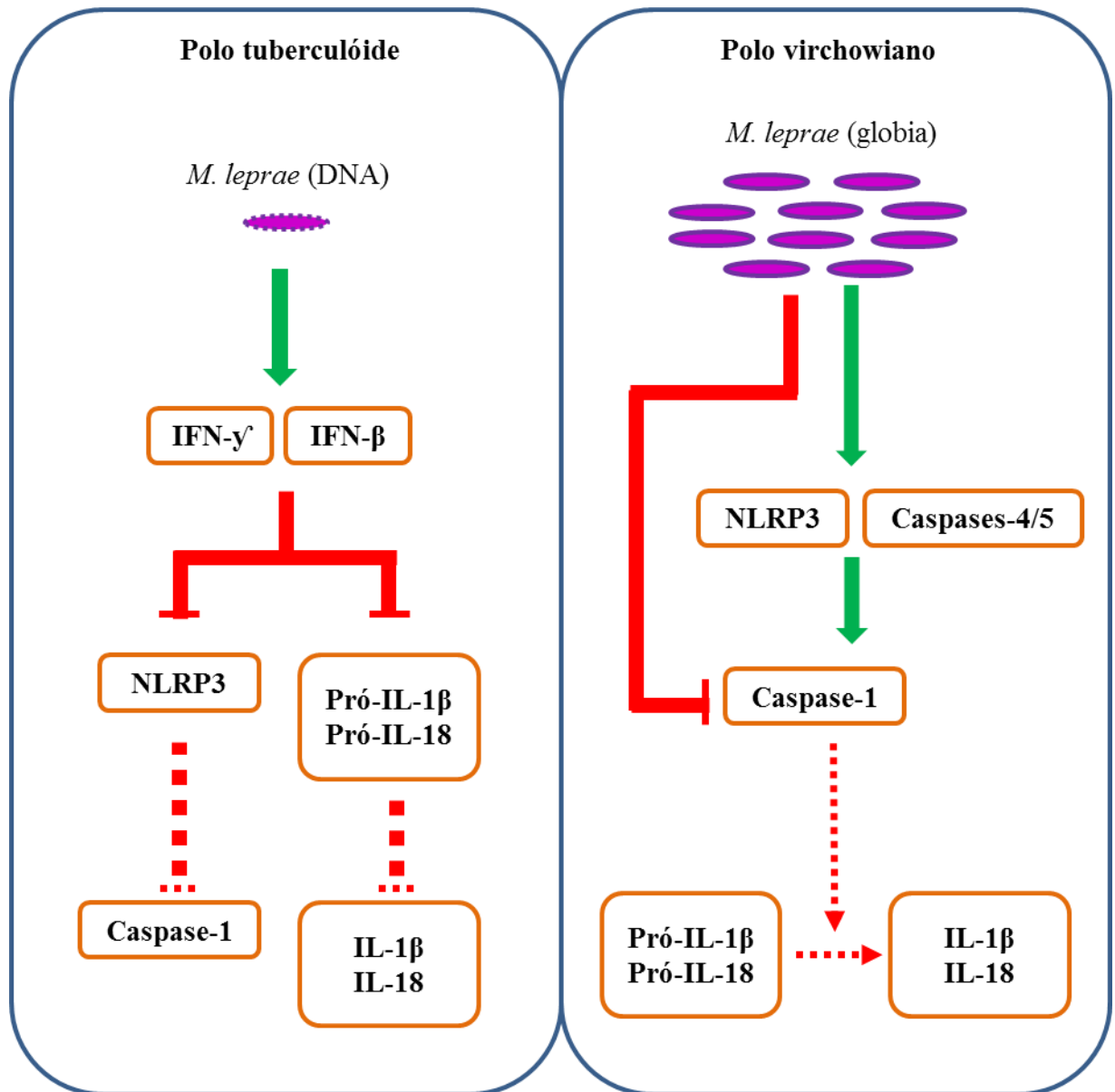


FIGURA 21 – Mecanismos de interação do inflamassoma NLRP3 com o *M. leprae*.

7 - CONCLUSÃO

7 – CONCLUSÃO

Este estudo identificou padrões de reatividade de biomarcadores do inflamassoma NLRP3 em fragmentos de biópsia de pele de pacientes hansenianos das formas polares virchowiana e tuberculoide e formas interpolares, contribuindo assim para o melhor entendimento do papel da imunidade inata na hanseníase.

Em conjunto, os resultados desta pesquisa permitem concluir que, apesar da hiperexpressão dos biomarcadores NLRP3 e caspases-4/5 no polo virchowiano da hanseníase, o inflamassoma NLRP3 não participa ativamente da resposta imune inata na hanseníase.

Outros estudos, notadamente *in vivo*, fazem-se imperativos para a percepção mais clara e comprovação dos mecanismos de ativação e funções dos inflamassomas na hanseníase hipoteticamente levantados na interpretação dos resultados deste trabalho. Essa perspectiva está sendo discutida e viabilizada como continuidade dessa linha de pesquisa sobre a imunopatologia da hanseníase, no nosso Programa de Pós-Graduação em Patologia.

Assim, esse trabalho, juntamente com a continuidade das pesquisas produziu conhecimento para auxiliar o melhor entendimento da predição das evoluções clínicas da doença e a busca ou desenvolvimento de biomarcadores de evolução da morbidade, prognóstico e resposta terapêutica da hanseníase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bhat RM, Prakash C. Leprosy: an overview of pathophysiology. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2012;2012:181089. Doi: 10.1155/2012/181089.

Briken V, Ahlbrand SE, Shah S. Mycobacterium tuberculosis and the host cell inflammasome: a complex relationship. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Oct 9;3:62. doi: 10.3389/fcimb.2013.00062. eCollection 2013.

Brodsky IE, Monack D. NLR-mediated control of inflammasome assembly in the host response against bacterial pathogens. *Seminars in Immunology*. 2009;21; 199–207.

Bryant C, Fitzgerald KA. Molecular mechanisms involved in inflammasome activation. *Trends in Cell Biology*. 2009;19(9):455-64.

Costa RD1, Mendonça VA, Lyon S, Penido RA, Costa AM, Costa MD, Nishi MP, Teixeira MM, Teixeira AL, Antunes CM. Evaluation of the expression of interleukin 1 beta (IL-1beta) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41 Suppl 2:99-103.

De Souza VN, Iyer AM, Lammas DA, Naafs B, Das PK. Advances in leprosy immunology and the field application: a gap to bridge. *Clin Dermatol*. 2016 Jan-Feb;34(1):82-95. doi: 10.1016/j.clindermatol.2015.10.013. Epub 2015 Nov 6. PubMed PMID: 26773628.

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

Fitzner N, Zahner L, Habich C, Kolb-Bachofen V. Stimulatory type A CpG-DNA induces a Th2-like response in human endothelial cells. *Int Immunopharmacol*. 2011 Nov;11(11):1789-95. doi: 10.1016/j.intimp.2011.07.006.

Garcia VE, Uyemura K, Sieling PA, Ochoa MT, Morita CT, Okamura H, Kurimoto M, Rea TH, Modlin RL. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol.* 1999 May 15;162(10):6114-21.

Gallo MEN, Ramos Jr AN, Albuquerque ECA, Nery JAC, Salles AM. Alocação do paciente hanseniano na poliquimioterapia: correlação da classificação baseada no número de lesões cutâneas com os exames baciloscópicos. *An Bras Dermatol.* 2003;78:415-24.

Gigliotti P. Avaliação da função macrofágica na hanseníase virchowiana: marcadores de superfície, receptores TLR e NLR e mediadores inflamatórios. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, 2014.

Goulart IMB, Penna, GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium Leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(4):365-75.

Gulia A, Fried I, Massone C. New insights in the pathogenesis and genetics of leprosy. *F1000 Med Rep.* 2010 Apr 27;2. pii: 30. doi: 10.3410/M2-30. PubMed PMID:20948855; PubMed Central PMCID: PMC2948396.

Hall BG, Salipante SJ. Towards the molecular epidemiology of *Mycobacterium leprae*: strategies, successes, and shortcomings. *Infect Genet Evol.* 2011 Oct;11(7):1505-13. doi: 10.1016/j.meegid.2011.06.003.

Hansen GHA. Investigations concerning the etiology of leprosy. *Norsk Magazin for Lægevidenskaben.* 1874;4:1-88 (Norwegian).

Hashimoto K, Maeda Y, Kimura H, Suzuki K, Masuda A, Matsuoka M, Makino M. *Mycobacterium leprae* infection in monocyte-derived dendritic cells and its influence on antigen-presenting function. *Infect Immun.* 2002 Sep;70(9):5167-76.

He Y, Hara H, Nuñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci.* 2016 Dec;41(12):1012-1021. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.002. Epub 2016 Sep 23.

Henao-Mejia J, Elinav E, Strowig T, Flavell RA. Inflammasomes: far beyond inflammation. *Nature*. 2012 Apr;13(4):321-24.

Jiménez Fernández D, Lamkanfi M. Inflammatory caspases: key regulators and cell death. *Biol Chem*. 2015 Mar;396(3):193-203. doi: 10.1515/hsz-2014-0253.

Kowalska M, Kowalik A. *Mycobacterium leprae*: pathogenic agent in leprosy. Discovery of new species *Mycobacterium lepromatosis*, Perspectives in research and diagnosis of leprosy. *Int Marit Health*. 2012;63(4):213-8.

Kang TJ, Lee GS, Kim SK, Jin SH, Chae GT. Comparison of two mice strains, A/J and C57BL/6, in caspase-1 activity and IL-1 β secretion of macrophage to *Mycobacterium leprae* infection. *Mediators Inflamm*. 2010;2010: 1-5.

Lastória JC, Abreu MA. Leprosy: review of the epidemiological, clinical and etiopathogenic aspects – part 1. *An Bras Dermatol*. 2014 Mar-Apr;89(2):205-18. Review. PubMed PMID: 24770495; PubMed Central PMCID: PMC4008049.

Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasome. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13; 397-411.

Massone C, Belachew WA, Schettini A. Histopathology of the lepromatous skin biopsy. *Clin Dermatol*. 2014;33:38-45.

Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, Timmins GS, Sander P, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe*. 2008 Apr 17;3(4):224-32. doi: 10.1016/j.chom.2008.03.003.

Mendonça VA, Costa RD, Melo GEBA, Antunes CM, Teixeira AL. Imunologia da hanseníase. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2008;83(4):343-50.

Ministério da Saúde (2000). Secretaria de Políticas de Saúde, Área Técnica de Dermatologia Sanitária. Legislação sobre o controle da Hanseníase no Brasil, Brasília.

Miranda AM, Antunes SL, Nery JA, Sales AM, Pereira MJ, Sarno EN. Erythema multiforme in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107:34-42.

Mishra BB, Rathinam VA, Martens GW, Martinot AJ, Kornfeld H, Fitzgerald KA, Sasseti CM. Nitric oxide controls the immunopathology of tuberculosis by inhibiting NLRP3 inflammasome-dependent processing of IL-1 β . *Nat Immunol*. 2013 Jan;14(1):52-60. doi: 10.1038/ni.2474.

Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol*. 1994;102(6):828-832.

Murray RA, Siddiqui MR, Mendillo M, Krahenbuhl J, Kaplan G. *Mycobacterium leprae* inhibits dendritic cell activation and maturation. *J Immunol*. 2007 Jan 1;178(1):338-44.

Nath I, Saini C, Valluri VL. Immunology of human leprosy and diagnostic challenges. *Clin Dermatol*. 2014;33:90-98.

Nestle FO, Di Meglio P, Qin J-Z, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nature reviews Immunology*. 2009;9(10):679-691. doi: 10.1038/nri2622.

Oliveira AR, Fernandes CA, Lima CRC. Atualização sobre critério de tempo para diagnóstico tardio da hanseníase. *Cadernos ESP, Ceará*. 2014;8(2):77-91.

Pontillo A, Laurentino W, Crovella S, Pereira AC. NLRP1 haplotypes associated with leprosy in Brazilian patients. *Infect Genet Evol*. 2013 Oct;19:274-9. doi: 10.1016/j.meegid.2013.06.006.

Paiva-Oliveira EL, Silva AC, Silva RM, Sevenini LA, Melo HA, Lagrota-Candido J, Quirico-Santos T. Inflamassoma e sua repercussão clínica: revisão da literatura. *R Ci Med Biol*. 2012;11(1):96-102.

Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012 Apr 20;12(5):352-66. doi: 10.1038/nri3211. Review. PubMed PMID:22517424.

Richmond JM, Harris JE. Immunology and skin in health and disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 Dec 1;4(12):a015339. doi: 10.1101/cshperspect.a015339. Review. PubMed PMID: 25452424.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy for research purposes. *Lepr. Rev*. 1962;33(2):119-128.

Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int. J. Lepr*. 1966;84(3): 255-273.

Rodrigues LC, Lockwood DNJ. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis*. 2011;11:464-70.

Salmon JK, Armstrong CA, Ansel, JC. The skin as an immune organ. *West J Med*. 1994 Feb;160(2):146-52. Review. PubMed PMID: 8160465; PubMed Central PMCID: PMC1022320.

Schoroder K, Tschopp, J. The inflammasomes. *Cell*. 2010;140; 821-832.

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

Shah JA, Berrington WR, Vary JC Jr, Wells RD, Peterson GJ, Kunwar CB, Khadge S, Hagge DA, Hawn TR. Genetic variation in Toll-interacting protein is associated with leprosy susceptibility and cutaneous expression of interleukin 1 receptor antagonist. *J Infect Dis*. 2016 APR 1;213(7):1189-97. doi: 10.1093/in fdis/jiv570. Epub 2015 Nov 26.

Shao BZ, Xu ZQ, Han BZ, Su DF, Liu C. NLRP3 inflammasome and its inhibitors: a review. *Front Pharmacol*. 2015 Nov 5;6:262. doi: 10.3389/fphar.2015.00262. eCollection 2015.

Silva CA, Danelishvili L, Mcnamara M, Berredo-Pinho M, Bildfell R, Biet F, Rodrigues LS, Oliveira AV, Bermudez LE, Pessolani MC. Interaction of *Mycobacterium leprae* with human airway epithelial cells: adherence, entry, survival, and identification of potential adhesins by

surface proteome analysis. *Infect Immun*. 2013 Jul;81(7):2645-59. doi: 10.1128/IAI.00147-13. Epub 2013 May 13. PubMed PMID: 23670556; PubMed Central PMCID: PMC3697615.

Sinsimer D, Fallows D, Peixoto B, Krahenbuhl J, Kaplan G, Manca C. *Mycobacterium leprae* actively modulates the cytokine response in naïve human monocytes. *Infect Immun*. 2010 Jan;78(1):293-300. doi: 10.1128/IAI.00816-09. Epub 2009 Oct 19.

Stowe I, Lee B, Kayagaki N. Casáse-11: arming the guards against bacterial infection. *Immunol Rev*. 2015 May;265(1):75-84. doi: 10.1111/imr.12292.

Takano K, Kondo A, Kurose M, Yamashita K, Nomura K, Obata K, Murayama K, Ito F, Himi T. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:98-104. doi: 10.1159/000441884.

Talhari C, Talhari S, Penna GO. Clinical aspects of leprosy. *Clin Dermatol*. 2015 Jan-Feb;33(1):26-37. doi: 10.1016/j.clindermatol.2014.07.002. Review. PubMed PMID:25432808.

Teles DO, Sherlock J, Melo EV, Rollemberg KCV, Paixao TRS, Yasmin Abuawad G, Simon MV, et. al. (2013). Clinical variables associated with leprosy reactions and persistence of physical impairment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. doi:10.1590/0037-8682-0100-2013.

Veerdonk FL. et. al. Inflammasome activation and IL-1b and IL-18 processing during infection. *Trends in Immunology*. 2011;32(3):110-16.

Walker SL, Lockwood DNJ. Leprosy. *Clin Dermatol*. 2007;25:165-172.

WHO (1982). Chemotherapy of leprosy for control programmes. Technical report series 675. World Health Organization, Geneva.

WHO (1988). Expert Committee on Leprosy: fifth report. Technical report series 678. World Health Organization, Geneva.

WHO (2014). Global Health Observatory data repository – Neglected tropical diseases. 2014. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.A1629NTD?lang=en>.

WHO World Health Organization. “Leprosy: fact sheet no. 101”. World Health Organization (2015). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/>.

Yang J, Liu Z, Xiao TS. Post-translational regulation of inflammasome. *Cell Mol Immunol*. 2017 Jan;14(1):65-79. doi: 10.1038/cmi.2016.29. Epub 2016 Jun 27.

Yonn GS, Keswani RK, Sud S, Rzecicki PM, Murashov MD, Koehn TA, Standiford TJ, Stringer KA, Rosania GR. Clofazimine biocrystal accumulation in macrophages upregulates interleukin 1 receptor antagonist production to induce a systemic anti-inflammatory state. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3470-9.

Zoete MR. et. al. Inflammasomes. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2014;6:1-23.

ANEXOS

1 – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ASSOCIAÇÃO DE BIOMARCADORES ÀS DIFERENTES FORMAS IMUNOPATOLÓGICAS DA HANSENÍASE

Pesquisador: MARCELO PASCOAL

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 44577215.9.0000.5149

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina da UFMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.096.700

Data da Relatoria: 03/06/2015

Apresentação do Projeto:

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa crônica, potencialmente incapacitante, de grande relevância para a saúde pública brasileira. A evolução da infecção está relacionada com a resposta imune do hospedeiro frente ao bacilo. Entretanto, os mecanismos locais ou dérmicos, que estão envolvidos no estabelecimento/manutenção das diferentes formas clínicas da hanseníase, são pouco conhecidos. Diante disso, este presente estudo transversal objetiva associar biomarcadores do inflamassoma e piroptose às diferentes formas imunopatológicas da hanseníase. Para tanto, foram planejadas, em amostras de pele humana, processadas e arquivadas nos laboratórios do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas/UFMG e do Centro Especializado em Anatomia Patológica (CEAP), entre 2000 e 2015, com diagnóstico de hanseníase, as metodologias de imunohistoquímica (qualitativa) e reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (quantitativa), para pesquisa dos biomarcadores Caspases 1 e 11, Interleucinas 1 beta e 17 e proteína NLRP3 (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3). Essas análises serão realizadas no Laboratório Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da UFMG e no Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou CPqRR/FIOCRUZ. Para comparar a expressão dos biomarcadores nos diferentes grupos e analisar a relação entre as variáveis qualitativas e quantitativas, serão utilizados os testes Z, Qui-quadrado, correlação linear de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 8627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.096.700

Spearman (dados não paramétricos) ou de Pearson (dados paramétricos). As diferenças estatisticamente significativas serão consideradas quando $p < 0.05$. Para estabelecer modelos estatísticos preditivos da relação entre os biomarcadores e as formas clínicas da hanseníase, será utilizada a análise de regressão logística multinomial. Esta análise será conduzida com o programa VGAM do software estatístico R.

Objetivo da Pesquisa:

- Objetivo Primário:

+ Associar biomarcadores do inflamassoma e piroptose às diferentes formas imunopatológicas da hanseníase.

- Objetivo Secundário:

- a) Padronizar a classificação histopatológica das biópsias de pele selecionadas;
- b) Comparar o padrão de expressão imuno-histoquímica das citocinas IL-1, IL-18, IL-33, NLRP3, Caspase 1 e Caspase 11 das diferentes formas imunopatológicas da hanseníase;
- c) Comparar a expressão do mRNA das citocinas IL-1, IL-18, IL-33, NLRP3, Caspase 1 e Caspase 11 das diferentes formas imunopatológicas da hanseníase;
- d) Relacionar a expressão das citocinas IL-1, IL-18, IL-33, NLRP3, Caspase 1 e Caspase 11 aos critérios histopatológicos das diferentes formas imunopatológicas da hanseníase.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

- Riscos:

+ Riscos biológicos, físicos e químicos: não haverá riscos físicos aos sujeitos da pesquisa porque o projeto objetiva, exclusivamente, a manipulação das amostras biológicas (biópsias) arquivadas nos laboratórios supracitados. Riscos sociais: riscos sociais de quebra da confidencialidade ou perda de privacidade serão mínimos porque o projeto prevê apenas o uso de informações demográficas (idade, sexo, procedência) presentes na requisição do exame da biópsia. Essas informações demográficas serão codificadas no computador do pesquisador responsável. Não há previsão de uso de informações dos prontuários dos sujeitos da pesquisa no projeto.

- Benefícios:

+ Possíveis benefícios: produção de conhecimento sobre a imunidade inata relacionada à hanseníase.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.096.700

Trata-se de um estudo que utilizará amostras de pele humana armazenadas em laboratórios de patologia clínicas para o seu desenvolvimento, sem contato direto com os participantes, justificando a dispensa de TCLE. O seu mérito foi previamente analisado e os seus resultados serão importantes para o melhor entendimento da regulação imune na hanseníase e a identificação de biomarcadores prognósticos da doença.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Projeto de pesquisa (projeto apresentado no antigo protocolo do COEP-UFMG);
- Informações básicas do projeto de pesquisa;
- Folha de rosto devidamente assinada pelo pesquisador responsável e pelo Diretor da Faculdade de Medicina da UFMG;
- Parecer consubstanciado da câmara do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG;
- Solicita dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por utilizar utilizadas amostras armazenadas em parafina dos arquivos dos laboratórios do Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do Hospital das Clínicas da UFMG e do Centro Especializado em Anatomia Patológica (CEAP);
- Protocolo da DEPE/UFMG;
- Anuência da gerente do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas/UFMG para realização da pesquisa;
- Anuência do gerente do Centro Especializado em Anatomia Patológica (CEAP) para realização da pesquisa;
- Anuência da diretora do Laboratório de Pesquisas Clínicas do Centro de Pesquisas René Rachou CPqRR/FIOCRUZ para a realização da pesquisa.

Recomendações:

- Anexar o projeto na íntegra na plataforma Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pelo exposto, sou, SMJ dos demais membros do COEP/UFMG pela aprovação do projeto de pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4562 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.096.700

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

BELO HORIZONTE, 08 de Junho de 2015

Assinado por:
Telma Campos Medeiros Lorentz
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

2 – MANUSCRITO PARA PERIÓDICO CIENTÍFICO – VERSÃO PRELIMINAR
(The Journal of Infectious Diseases)

Title page

Expression of NLRP3 inflammasoma in leprosy indicates immune evasion of *M. leprae*

Ana Luisa Gomes Mendes

Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, Faculty of Medicine – UFMG

Heloísa Di Matteo Joaquim

Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, Faculty of Medicine – UFMG

Mara Inês Stefanini Zamae

Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, Faculty of Medicine – UFMG

Ramon Meira Assis

Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, Faculty of Medicine – UFMG

Fernanda César e Silva Barros

Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, Faculty of Medicine – UFMG

Antônio Carlos Martins Guedes

Department of Medical Clinic, Faculty of Medicine – UFMG

Edward José Oliveira

Institute René Rachou - FIOCRUZ

Vanessa Peruhype Magalhães

Institute René Rachou - FIOCRUZ

Marcelo Antônio Pascoal-Xavier

Department of Pathological Anatomy and Legal Medicine, Faculty of Medicine – UFMG

Correspondence:

Marcelo Antônio Pascoal Xavier

Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina – UFMG

*Endereço: Av. Prof. Alfredo Balena, 190, Sala 316. Belo Horizonte - MG - Brasil - Cep 30130-100 - Tel:+55 0 31 3409-9123.

#E-mail: mpascoal@medicina.ufmg.br

Word Count

Abstract=

Text=

Summary

Although the impact of leprosy on public health and its spectral clinicopathological manifestation strictly dependent on innate immunity, the evidence of the involvement of inflammasoma in its pathogenesis are very recent and scarce. A direct immunophenotypic characterization of inflammasoma in human skin samples of different leprosy immunopathological forms is warranted and may help to better understand the prediction of clinical evolution of the disease and to search for or develop markers of evolution of morbidity, prognosis and therapeutic response.

Footnote page

Potential Conflicts of Interest

The authors do not have a commercial or other association that might pose a conflict of interest.

Abstract

Background. Leprosy still remains a serious public health problem in Brazil. This neglected disease has a wide range of clinical and histopathological manifestations, which are related to the host inflammatory and immune responses. More recently, inflammasome, a complex set of proteins, has assumed a relevant role in the inflammatory response against microbiological agents. However, the involvement of inflammasome in leprosy is poorly understood.

Methods. We performed an observational, cross-sectional and comparative study of the immunophenotypic expression of inflammasome-associated proteins in immunopathological forms of leprosy by immunohistochemistry. The intensity and percentage of NLRP3, caspase-

1 and 4/5 and interleukin (IL) 1 β and 18 immunoreactivities in the epidermal, inflammatory infiltrate and endothelial compartments of skin biopsies were evaluated.

Results. Strong expression of NLRP3 and inflammatory caspases 4/5 were observed in all compartments of the Virchowian pole. In addition, were observed low expression of caspase-1, IL-1 β and IL-18 in all anatomoclinical forms. The interpolar or borderline form showed immunophenotype predominantly similar to the Virchowian pole.

Conclusion. Despite of the strong activation of NLRP3 inflammasome classic and noncanonical pathways in the multibacillary forms, the results demonstrate the inactivation of NLRP3 inflammasome in the leprosy, suggesting immune evasion of *M. leprae*, which can be used as a leprosy biomarker.

Keywords: Leprosy; Inflammasome; NLRP3; Caspase.

INTRODUCTION

Leprosy is a chronic, neglected infectious-contagious disease caused by *Mycobacterium leprae*, an obligate, intracellular, alcohol-acidic bacillus. It is endemic in several tropical countries, particularly in underdeveloped or developing. Despite the sustained reduction in its overall prevalence, at 0.32 per 10,000 population by 2014, a total of 105 countries remain endemic or with one or more patients for every 10,000 inhabitants. Among these endemic countries, Brazil stands out, representing about 90% of prevalent cases and new cases in South America and, together with India, about 70% of new cases worldwide [1].

Clinical and immunopathological, leprosy presents as a spectral disease between stable poles tuberculoid, high resistance to bacillary infection, and Virchowian, high susceptibility, containing intermediate, unstable or overlapping forms of the disease, called dimorphs or borderline. This spectral presentation of the disease expresses a direct relation with the standard of immunity developed by the host, from the recognition of *M. leprae* by the cells of the innate immune system [2-4].

In the immunopathogenesis of leprosy, the evidence of whether or not the inflammation is involved and the possible mechanisms of immune evasion of *M. leprae* are very recent and scarce, making this fact the main problem of this study. Regarding the general mechanisms of regulation of NLRP3 inflammation in the most diverse nosology, the model of the two signals, for its classic pathway activation, is already well established, with important participation of the NF κ B in the first signal and of the elements efflux of potassium, intracellular increase of calcium, mitochondrial rupture in the second signal. In addition to this classical route, the non-canonical and alternative routes are also very relevant [5]. The noncanonical pathway requires

previous activation of homologous inflammatory caspases 4, 5 and 11 directly by microbial products or particles, such as liposaccharide (LPS) from Gram negative bacteria. Microbial molecules, such as LPS, by mechanisms that have not yet been clarified, that require the participation of caspase 8, directly activate the alternative pathway. Once constituted, the NLRP3 inflammasoma, through caspase 1, acts on the maturation and release of IL-1 β / IL-18 and promotes inflammatory response with or without cell death [5].

However, information on the participation of mycobacteria in the activation and regulation processes of inflammasoma remains very limited. Except for studies related to *M. tuberculosis*, whose participation in the regulation of inflammation is considered to be very complex and predominantly inhibitory of its activation, works directed to *M. leprae* are relatively rare and controversial [6-8].

A study evaluated the activation of caspase 1 and IL-1 β secretion in macrophages. This study demonstrated the reduction in the activation of caspase 1 and IL-1 β secretion in macrophages of the A / J line after stimulation with *M. leprae*, indicating the mechanism of evasion of this agent [9]. Differently, another study demonstrated high levels of IL-1 β in patients with leprosy regardless of clinical form, in comparison with healthy individuals, suggesting activation of the cellular immune response [10].

Thus, in view of the problem presented above, we aimed to associate the immunohistochemical expression of inflammatory biomarkers in the different immunopathological forms of leprosy and found weak expression of the end products of the NLRP3 pathway, suggesting immune evasion of *M. leprae*.

METHODS

Ethical considerations

All recommendations and norms of research involving human beings, contained in Resolution 466/2012 of the National Health Council, to safeguard the rights and well-being of the people studied, were adopted in this study. This project was forwarded and approved by the Research Ethics Committee of the UFMG (COEP) under the CAAE no. 14887414.0.0000.5149.

Study design and strategies

This is an observational, cross-sectional and comparative study of the aspects of immunohistochemical marking of 99 samples (biopsies) of skin lesions of patients diagnosed or diagnosed suspected of leprosy, from 2000 to 2015, from the Leprosy Outpatient Clinic of the Annex of Dermatology Osvaldo Costa of Clinical Hospital of UFMG.

Considering clinical, immunopathological and operational aspects of Leprosy, the following groups were defined for study: L (Virchowian and borderline multibacillary forms or Virchowian borderline or Virchowian leprosy pole); T (paucibacillary forms Tuberculous and borderline or Tuberculoid border of Tuberculous leprosy pole); B (polar or non-polar forms Virchowian or Tuberculoid Leprosy); D (non-specific dermatitis, proven not to be associated or unrelated to leprosy).

Samples that met the following criteria were included: a) Age greater than 18 and less than 75 years; B) Sample size larger than 3 mm in diameter. Samples from immunocompromised or diagnosed patients with HIV / AIDS, tuberculosis or autoimmune diseases were excluded.

Immunohistochemistry

Histological slides containing 5 μm serial sections of the paraffin samples were incubated overnight at 56 ° C in an oven. Subsequently, the samples were submitted to dewaxing and rehydration stages, with three washes in xylol, for five minutes each, and three washes in ethyl alcohol (PA), for five minutes. After rehydration, the heat-induced antigenic recovery was performed in 0.01 M sodium citrate solution (pH 6.0) at 90°C for 20 minutes in the steam and cooled to room temperature for 20 minutes. Endogenous tissue peroxidase and nonspecific proteins were blocked at different stages. The immunohistochemical labeling was done separately with the following primary antibodies: anti-NLRP3 (Cryopyrin-H-66: sc-66846, Santa Cruz Biotechnology, INC), anti-CASP1 (Caspase-1-14F468: sc-56036, Santa Cruz Biotechnology, INC); Anti-CASP4 / 5 (Caspase-11 p20-A2: sc-374615, Santa Cruz Biotechnology, INC); Anti-IL-18 (IL-18-H173: sc-7954, Santa Cruz Biotechnology, INC); And anti-IL-1 β (IL-1 β -2H12: sc-130323, Santa Cruz Biotechnology, INC). Several tests, with skin samples donated by the Laboratory of Molecular Pathology, were performed to standardize the primary antibodies. Dilutions of 1: 500 were defined for primary anti-NLRP3, anti-CASP1 and anti-IL β primary antibodies; 1: 300 for the primary anti-CASP4 / 5 and anti-IL-18 antibodies.

For the detection of primary antibodies, the NovoLink Max Polymer Detection Novocastra™ kit (Leica Microsystems) was used. The slices were incubated with the NovoLink kit universal polymer detection system for 30 minutes at room temperature. Subsequently, 200 µL of the developer solution supplied by the kit containing the chromogen diaminobenzidine 3,3 (DAB) was added and the reaction incubated at room temperature for five minutes. The staining was performed by immersing the slides in Harris hematoxylin solution (Code 248, Vetec) for 30 seconds. The slides were analyzed using the Olympus BX optical microscope. The qualitative and semi-quantitative analyzes were carried out in fields under magnification of the microscope (40x) in random areas and suitable for the interpretation of the two observers. The final classifications were obtained by consensus between the two observers. In order to control and monitor the quality of the immunohistochemical reactions, external and internal controls were used. The external control used five healthy skin samples from mammography. The internal control used the epithelial compartment of the samples.

For the analyzes, the intensity and the percentage of the cellular immunoreactivity of the immunohistochemical marking of the epithelium (EP), the inflammatory infiltrate (II) and the endothelium (EN) were classified in quartiles. Subsequently, a score of immunohistochemical expression was established, based on an already accepted score [11]. Briefly, the product of the variables intensity and percentage was classified as overexpressed if greater than or equal to the result four.

Statistical analyzes

The results were stored in spreadsheets using the EXCEL program and submitted to the analysis through the R (version 3.1.2) and MINITAB 17 (version 17) programs. For descriptive analyzes, the categorical variables of the qualitative and semi-quantitative approaches were presented as numbers and percentages. For the comparative analysis of the difference between the groups, Student's t-test was used. To establish a relationship between immunohistochemical expression scores and research groups, a multinomial logistic regression model was fitted using the logistic function in the R and VGAM package. Statistically significant differences were considered when $p < 0.05$.

RESULTS

NLRP3 is overexpression in Virchowian leprosy

The characterization of the NLRP3, caspase 4/5, caspase 1, IL-1 β and IL-18 biomarkers is shown in FIGURES 1, 2 and 3 below:

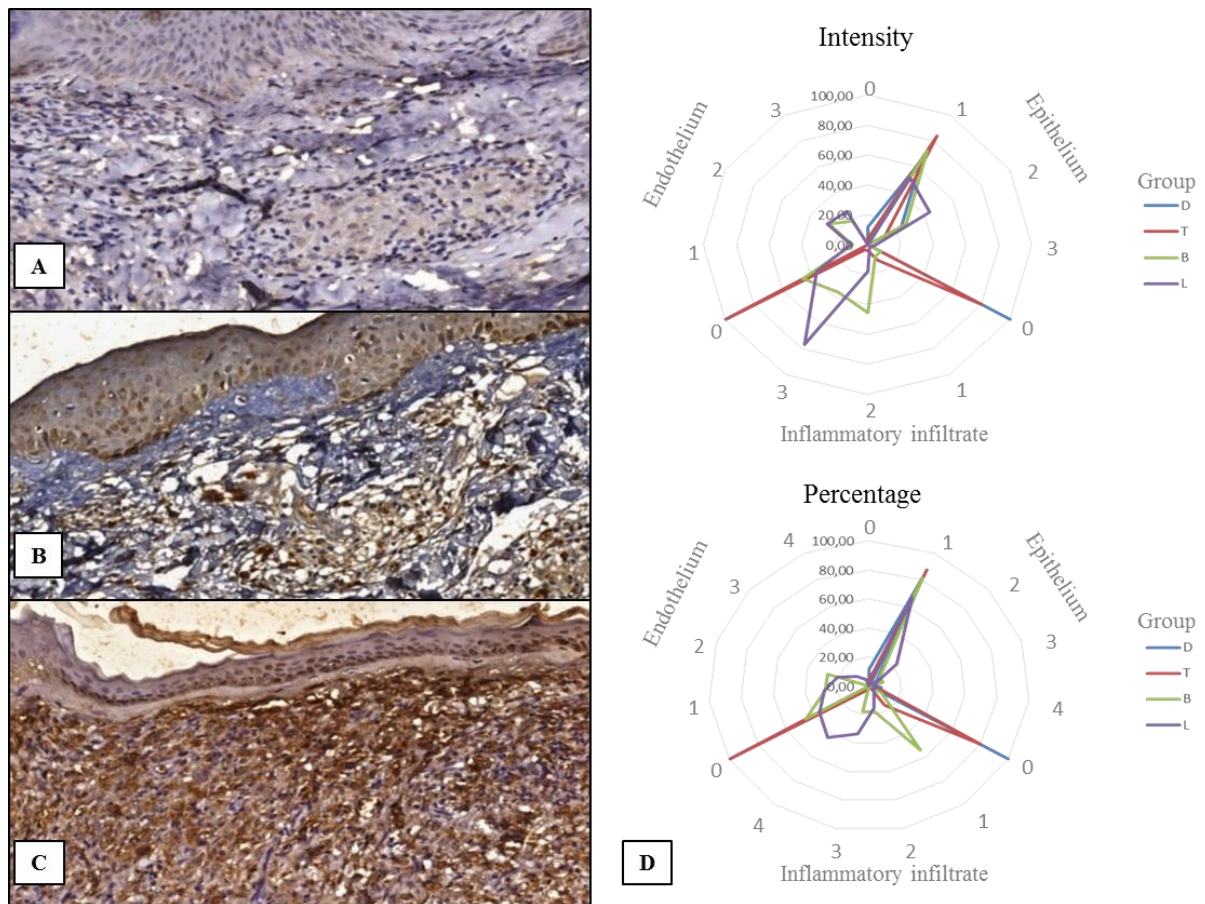


FIGURE 1. Expression of NLRP3 in the immunopathological forms of leprosy. A, T-group individual skin biopsy sample showing mild NLRP3 staining in granuloma macrophages and baseline keratinocytes; B, B group skin biopsy sample showing moderate NLRP3 staining on lymphocytes and macrophages, in addition to the basal third of the epithelium; C, Sample of skin biopsy of individual of group L showing intense and diffuse staining for NLRP3 in macrophages and basal keratinocytes. D, Radar plots of intensity (upper) and percentage (lower) of NLRP3 immunoreactivity in the epithelial, inflammatory and endothelial compartments of groups D, T, B and L. Highlight for the marked intensity and diffuse immunoreactivity of NLRP3 in the cells of the infiltrate inflammatory.

NLRP3 presented moderate or intense intensity in all compartments (epithelium, inflammatory infiltrate and endothelium) of group L. In the other groups, immunoreactivity with light intensity predominated. Considering only the inflammatory infiltrate, almost all (95%) samples from the L group showed moderate or intense immunoreactivity of NLRP3, a result almost

inverse to the NLRP3 intensity in the inflammatory cells of the D and T groups, where 100% and 80% of the inflammatory cells, respectively, presented absent intensity. Group B showed intermediate immunoreactivity between the L and T groups. The endothelial compartment reproduced the findings of the labeling of the inflammatory cells. In groups D and T, 100% of the endothelial cells showed no immunoreactivity. In group L, about 60% of the samples showed moderate / intense immunoreactivity of NLRP3. Regarding the percentage of marked inflammatory cells, about 80% of the L group presented cell reactivity above 50%. In groups D and T, virtually all samples did not show immunoreactivity. The percentage of cell reactivity in group B was predominantly basal.

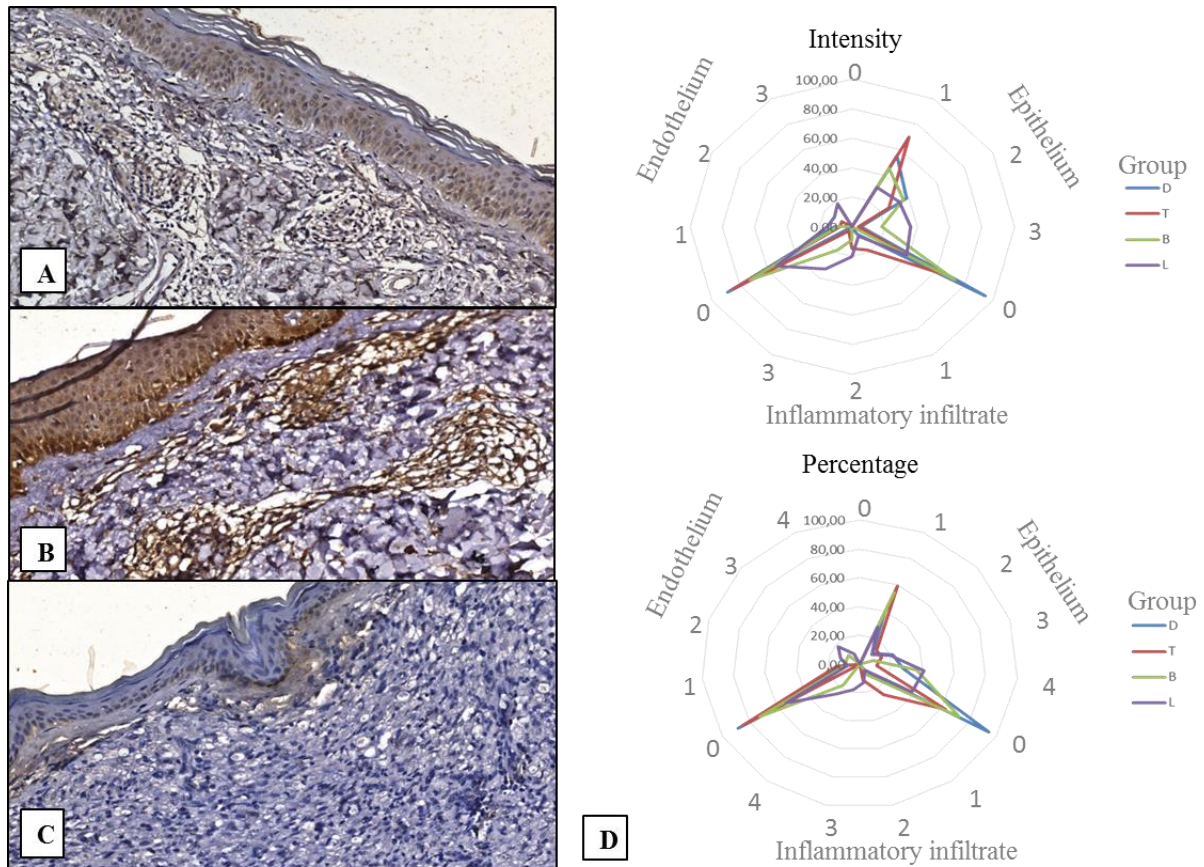


FIGURE 2. Expression of caspases-4/5 in the immunopathological forms of leprosy. A, T-group individual skin biopsy sample showing slight staining for Caspases-4/5 in inflammatory cells and two-thirds of the epithelium; B and C, Skin biopsy samples from individuals of groups B and L presenting intense staining for Caspases 4/5 in inflammatory cells and throughout the thickness of the epithelium; D, Radar graphs of intensity (upper) and percentage (lower) of the immunoreactivity of 4/5 caspases in the epithelial, inflammatory and endothelial compartments of groups D, T, B and L. Highlight for the moderate intensity and focal immunoreactivity of the Caspases -4/5 in the cells of the inflammatory infiltrate.

The Caspases 4/5 was distinguished in the inflammatory and endothelial infiltrates of the L group. Considering the inflammatory infiltrate, 20.51% and 33.33% of the L group samples showed moderate and intense immunoreactivity, respectively. The endothelium reproduced the

findings of inflammatory cells. In the D and T groups, approximately 85% of the endothelial cells did not show immunoreactivity and in the L group, 12.82% and 17.95% of the samples showed respectively moderate and intense immunoreactivity. In the epithelium, approximately 70% of the samples of group L presented moderate or intense intensity. In the other groups, about 60% of the samples showed epithelium with immunoreactivity with light intensity. Regarding the percentage of labeled inflammatory cells, similar to NLRP3, approximately 60% of the L group showed cell reactivity above 50%. In groups D, B and T, virtually all samples did not show immunoreactivity.

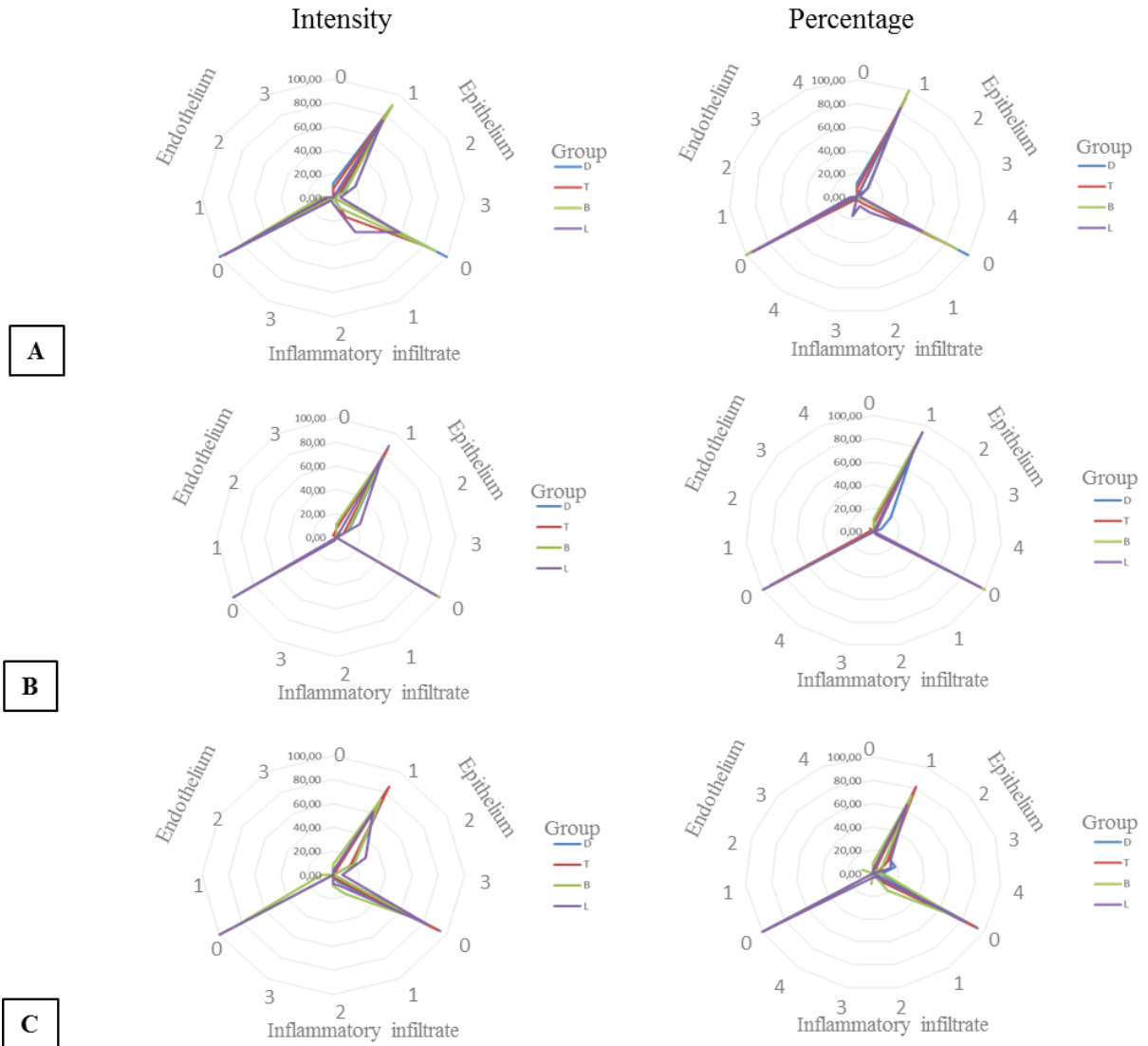


FIGURE 3. Radar graphs of expression of caspase-1 (A), IL-1 β (B) and IL-18 (C) in the immunopathological forms of leprosy. The graphs to the left demonstrate the slight intensity of immunohistochemical reactions in the epithelium (internal control of reactions) and the predominance of no staining in inflammatory and endothelial infiltrate cells. The graphs to the right demonstrate immunoreactivity in the basal third of the epithelium for all biomarkers.

The immunoreactivity of caspase 1, IL-1 β and IL-18 were very similar in all compartments of the samples from all study groups. Considering the epithelial compartment, most exhibited immunoreactivity with mild intensity. In the inflammatory infiltrate and in the endothelium, the majority did not present immunoreactivity.

Highlighted, most samples from the L group showed intense immunoreactivity of NLRP3 and caspase 4/5, differently from the D and T groups, which were absent or mild intensity. The immunoreactivity of caspase 1, IL-1 β and IL-18 was practically mild or absent in all study groups.

NLRP3 inflammasome immunohistochemical score differentiate Virchowian leprosy

To compare the immunohistochemical expression of the biomarkers between the study groups, the high or strong (1) and low (0) scores were calculated. TABLE 1 below shows the immunohistochemical expression scores of the NLRP3, caspase-1, caspase 4/5, IL-1 β , IL-6 and IL-18 biomarkers in the inflammatory infiltrate.

TABLE 1. Immunohistochemical scores of NLRP3, caspase-1, caspases 4/5, IL-1 β , IL-6 and IL-18 biomarkers in the inflammatory infiltrate.

BIOMARKER	SCORE	GROUP							
		D		T		B		L	
		n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
NLRP3	0	17	(100,00)	26	(96,30)	8	(72,73)	4	(10,26)
	1	0	(0,00)	1	(3,70)	3	(27,27)	35	(89,74)
Caspases-4/5	0	18	(100,00)	25	(92,59)	9	(81,82)	18	(46,15)
	1	0	(0,00)	2	(7,41)	2	(18,18)	21	(53,85)
Caspase-1	0	17	(100,00)	26	(96,30)	10	(100,00)	33	(91,67)
	1	0	(0,00)	1	(3,70)	0	(0,00)	3	(8,33)
IL-1 β	0	17	(100,00)	28	(100,00)	9	(100,00)	31	(100,00)

	1	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)
IL-18	0	17	(100,00)	28	(100,00)	11	(100,00)	24	(85,70)
	1	0	(0,00)	0	(0,00)	0	(0,00)	4	(14,30)

According to the values in TABLE 1 above, statistically significant differences were observed between the L group and the D and T groups for all sites. Notably, the expression of the NLRP3 biomarker in the inflammatory infiltrate of the L group samples was mostly strong and practically the opposite of the D and T groups ($p = 0.000$). Among the L and B groups, significant differences only in the inflammatory infiltrate ($p = 0.000$).

Also according to the values in TABLE 1, statistically significant differences were observed between the L group and the D, B and T groups in the expression of caspases 4/5 in the inflammatory infiltrate ($p = 0.000$). Notably, the expression of the biomarker caspases 4/5 in the inflammatory infiltrate of the L group samples was mostly strong and practically the opposite of the D, B and T groups.

In addition, no statistically significant differences were observed between D, B, T and L groups after comparison of caspase-1, IL-1 β and IL-18 expression in the inflammatory infiltrate of the samples examined. That is, all groups presented the same immunohistochemical pattern or weak caspase-1, IL-1 β and IL-18 expression in inflammatory compartments.

NLRP3 overexpression is associated with high risk of Virchowian leprosy

The relationship between leprosy disease groups and NLRP3 inflammasoma expression were determined using multinomial logistic regression analysis. TABLE 2 summarizes the results of the fitted model.

TABLE 2. Estimated coefficients, standard errors, z-scores, and two-tailed p-values for the final fitted multinomial logistic regression model

Predictor	Coefficients	SE	z-score	p value
Logit 1: (L/T)				
Constant	-1.87	0.53	-3.49	0.000
NLRP3	5.42	1.14	4.73	0.000
Logit 2: (D/T)				
Constant	-0.42	0.31	-1.36	0.173
NLRP3	-0.18	6500.13	-0.00	0.998
Logit 3: (B/T)				
Constant	-1.17	0.40	-2.92	0.004
NLRP3	2.27	1.22	1.86	0.063

Log-likelihood: -80,493

Abbreviations: SE – Standard error.

According to the model, The coefficient NLRP3 in Logit 1 (L / T) presented significant statistical significance. In Logit 2 (D / T) and 3 (B / T), the NLRP3 coefficient was not statistically significant. However, in Logit 3 (B / T), indicates trend of significance and high possibility of adjustment. Deviance residuals of the model indicated general goodness of fit of the model to the obtained data.

From the final model above, we calculated the odds ratio (OR). TABLE 3 below represents the OR values for the predictors, with confidence intervals. The results indicate substantial increases in L and B odds of the NLRP3 overexpression in related to T group, suggesting a predictive role of these biomarker.

TABLE 3. Results of the logistic regression analysis involving leprosy disease groups and NLRP3 predictors

	OR	95% CI	
		Lower	Upper
Logit 1: (L/T)	227.50	24.00	2156.94
Logit 2: (D/T)	0.00	0.00	*
Logit 3: (B/T)	9.75	9.75	107.25

* No goodness of fit test performed.

NLRP3 and caspase 4/5 present similarities in leprosy

Briefly, all comparisons between the D, B, T and L groups for the NLRP3 and caspase 4/5 biomarkers are demonstrated in FIGURE 4 below:

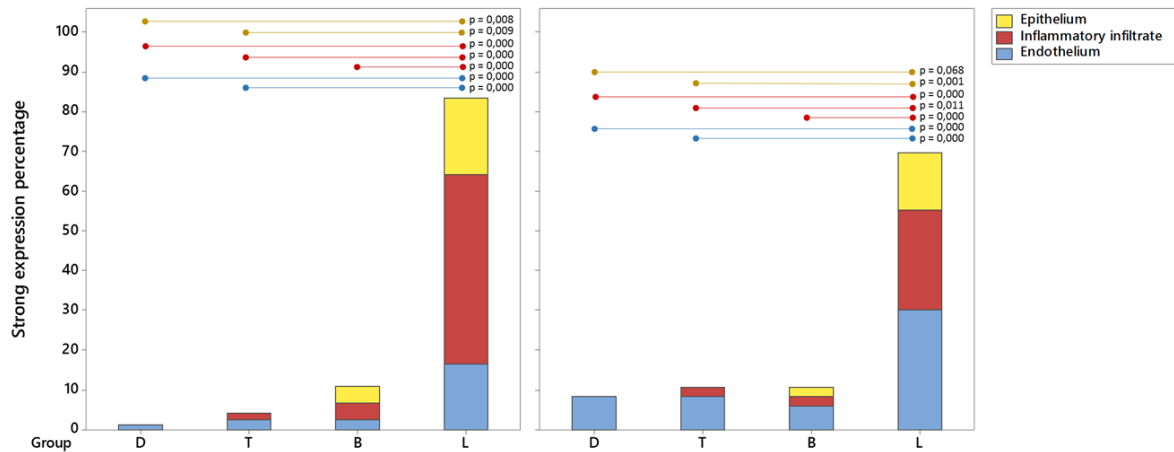


FIGURE 4. Barcodes of the strong expression (Score 1) of the NLRP3 (A) and 4/5 (B) biomarkers. Statistically significant differences ($p < 0.05$) between the groups were highlighted for each epithelial (yellow), inflammatory (red) and endothelial (blue) site or compartment. Taking the expressions of NLRP3 and caspases-4/5 from the L group as reference, statistically significant differences were observed with the inflammatory infiltrate of all groups and with the epithelium and endothelium of the D and T groups.

Notably, the bar graphs of FIGURE 4 above demonstrate the overexpression of the NLRP3 and Caspases 4/5 biomarkers in the L group samples, representing the lepromatous lepromatous lepromatous lepromatous pole, micro- and immunopathologically characterized by the large amount of the *M. leprae* bacillus and an inflammatory response with low levels of INF γ in relation to the T and D groups, representing the leprosy tuberculoid pole and dermatitis with no specific microbiological cause, respectively. No significant differences were observed in the epithelial and endothelial expressions of the NLRP3 and Caspases 4/5 biomarkers between the L and B groups. Together, were observed a large association of the NLRP3 and Caspases 4/5 biomarkers with the L group and a similarity between the L and B expression patterns for all biomarkers, in addition to the weak expression of caspase 1, IL-1 β and IL-18.

DISCUSSION

The present study presented relevant and original results for the extension and deepening of the knowledge about the participation or not of the inflammasoma in the immunopathogenesis of leprosy.

Together, expressive associations of the NLRP3 and caspase 4/5 biomarkers with the multibacillary forms, particularly the Virchowian form, were found due to the similarity between the L and B expression patterns in the epithelial, inflammatory infiltrate and endothelium compartments, besides the Poor expression of caspase-1, IL-1 β and IL-18 biomarkers in both multibacillary forms and paucibacillary forms.

Besides this hyperexpression of the NLRP3 and Caspase 4/5 biomarkers in the L and B groups, another significant result, this time due to the absence of statistically significant differences, was the poor expression of the caspase-1, IL-1 β and IL-18 biomarkers in all groups study. That is, irrespective of the presence or absence of *Mycobacterium leprae* in the Virchowian and tuberculoid poles, respectively, there is no immunophenotypic hyperexpression of the markers caspase-1, IL-1 β and IL-18 in the epithelium, inflammatory infiltrate cells and leprosy skin endothelium.

The main risk of bias in the production of these results was the subjectivity of the interpretation of immunohistochemistry. In order to mitigate or control this risk of subjectivity, three precautions were taken: 1) qualitative or descriptive analysis of immunohistochemical reactions in the epithelial, dermal and endothelial sites or compartments by two independent variables (intensity and percentage of reactivity); 2) semi-quantitative analysis of immunohistochemical reactions at the same sites by the use of immunohistochemical expression score, according to an already accepted score; 3^o) classification of immunohistochemical reactions by consensus between two independent observers.

Regarding NLRP3 inflammation, recent evidence suggests a more evident involvement of the NOD-like NLRP3 receptor family in the generation of a caspase-11 induced inflammation (similar in humans to inflammatory caspases 4/5) in response to bacterial infections, With the ability to readily gain access to the cytoplasm of host cells, such as tuberculosis and leprosy bacilli. However, the innate stimuli that activate these pathways are still unknown [12].

The strong expression of the NLRP3 and Caspases 4/5 biomarkers in the L and B group samples and weak expression in the T and D groups would be direct consequences of the action of *M.*

leprae on the activation of Inflammation in the samples of the Virchowian pole [12]. This bacillus, because it is present in a small number or absent at the tuberculoid pole, would not activate the inflammasoma in the samples of the T group, justifying the poor expression of the biomarkers NLRP3 and caspases 4/5.

These mechanisms of action of *M. leprae* and activation of the non-canonical pathway NLRP3 may be similar to the mechanism of most Gram negative bacteria, such as *Escherichia coli*, *Citrobacter rodentium* and *Vibrio cholerae*, which are constituted by the LPS molecule. It is believed that LPS has the ability to bind and directly activate caspase-11, homologous to human caspases 4/5 [5]. However, this hypothesis contrasts with the results of another study, one of the few published studies that address this issue. They suggest reduced activation or the effect of NLRP3 inflammasoma in the presence of *M. tuberculosis* [6].

In relation to the other set of relevant results, the low immunophenotypic expression of the caspase-1, IL-1 β and IL-18 non-epithelial biomarkers in inflammatory and non-endothelial infiltrate cells in leprosy skin samples (B, T and L groups), and in samples of non-microbiologically inflamed skin (group D), a larger, though still limited, number of studies addressing an issue and, in most cases, corroborate the results of the study.

Thus, and considering literature data on inflammation activation of the NLRP3 subfamily, which normally requires two signals, the first for the transcription of NLRP3, IL-1 β and pro-IL-18 dependent on the recognition of the microorganism; The second stimulus from cellular disorders (classical pathway) or contact of the microorganism as caspases-4/5, resulting in NLRP3-type formation, recruitment of Pycard adapter protein (ASC), caspase-1 activation and maturation of Pro-IL-1 β and pro-IL-18, the following methods aid all results of this study in the pauci and multibacillary forms of leprosy.

In the paucibacillary form of leprosy, represented in this study by the T group, there is a dermal microenvironment with type 1 response pattern, which is characterized, among others, by large expression of interferons, both type I and IFN- β , as well as IFN- γ , stimulated by the presence of *M. leprae* fragments, as deoxyribonucleic acid (DNA) residues. This large presence of IFN- β and IFN- γ may have a transcription of the factors NLRP3 and pro-IL-1 β and pro-IL-18 and, consequently, oppose the activation of inflammatory NLRP3. This mechanism is little dependent on the inflammatory response in the skin of non-infectious etiology, represented here by the pattern of immunohistochemical expression observed in group D.

In the multibacillary form of leprosy represented in this study by the B and MHD groups, there is a large presence of *M. leprae* bacilli in the macrophages and a dermal microenvironment with Type 2 response pattern, with low or low expression of interferons, mainly IFN- γ . In this case, the large amount of bacillus would be the main stimulatory factor for the transcription of NLRP3 and caspase-4/5 biomarkers, characterizing the immunophenotypic profile of NLRP3 inflammation. However, the same large presence of *M. leprae* would directly inhibit the expression of the caspase-1, IL-1 β and IL-18 biomarkers because of likely actions in the transcription and/or activation of caspase-1. Thus, as demonstrated in this study by the immunohistochemical expression pattern observed in the B and L groups, there would be an effective inactivation or non-participation of the NLRP3 inflammasoma and the immune evasion of *M. leprae* in leprosy.

FIGURE 5 below illustrates such hypothetical mechanisms of NLRP3 inflammation interaction with *M. leprae* within the leprosy immunopathology line.

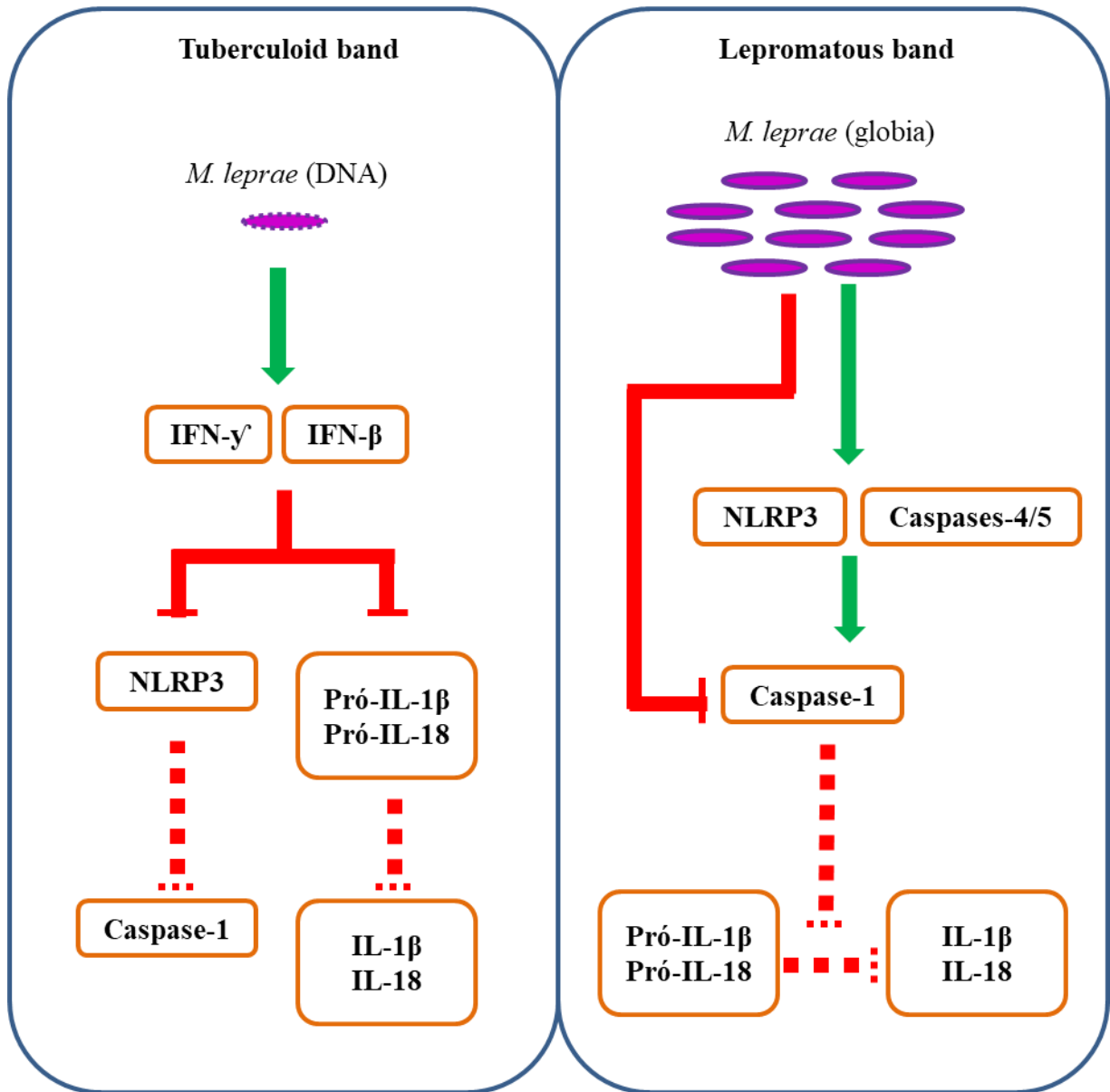


FIGURE 5. Mechanisms of NLRP3 inflammation interaction with *M. leprae*. Hypothetical mechanisms of NLRP3 inflammation interaction with *M. leprae*. In the tuberculoid range there is Type 1 immune response to *M. leprae* fragments, such as deoxyribonucleic acid (DNA) residues, which is characterized by high concentration of Type I interferons, such as IFN- β , and IFN- γ . These interferons directly inhibit the transcription of NLRP3 and pro-IL-1 β and pro-IL-18 factors. In the lepromatous range, there are large numbers of bacilli in macrophages (globes) and dermal microenvironment with Type 2 response pattern, characterized by low or low expression of IFN- γ . Bacilli stimulate the transcription of NLRP3 and caspase-4/5 biomarkers and NLRP3 inflammation hyperexpression by classical and non-canonical pathways. However, *M. leprae* itself inhibits the expression of caspase-1, IL-1 β and IL-18 by inhibitory actions on transcription and / or activation of caspase-1, favoring the immune evasion of *M. leprae*.

Taken together, the results of this research allow us to conclude that, despite the hyperexpression of the NLRP3 and caspase-4/5 biomarkers in the lepromatous leprosy pole,

the NLRP3 inflammasoma does not actively participate in the innate immune response in leprosy.

Thus, this work, along with the continuity of the research, produced knowledge to help better understand the prediction of the clinical evolution of the disease and the search or development of biomarkers of evolution of the morbidity, prognosis and therapeutic response of leprosy.

Potential Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

1. WHO World Health Organization. "Leprosy: fact sheet no. 101." World Health Organization (2015). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs101/en/>.
2. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five-group system. *Int. J. Lepr.* 1966;84(3): 255-273.
3. Goulart IMB, Penna, GO, Cunha G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium Leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002;35(4):365-75.
4. Eichelmann K, González González SE, Salas-Alanis JC, Ocampo-Candiani J. Leprosy. An Update: Definition, Pathogenesis, Classification, Diagnosis, and Treatment. 2013;104(7):554-563.
5. He Y, Hara H, Nuñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci.* 2016 Dec;41(12):1012-1021. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.002. Epub 2016 Sep 23.
6. Master SS, Rampini SK, Davis AS, Keller C, Ehlers S, Springer B, Timmins GS, Sander P, Deretic V. *Mycobacterium tuberculosis* prevents inflammasome activation. *Cell Host Microbe.* 2008 Apr 17;3(4):224-32. doi: 10.1016/j.chom.2008.03.003.
7. Briken V, Ahlbrand SE, Shah S. *Mycobacterium tuberculosis* and the host cell inflammasome: a complex relationship. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013 Oct 9;3:62. doi: 10.3389/fcimb.2013.00062. eCollection 2013.

8. Yang J, Liu Z, Xiao TS. Post-translational regulation of inflammasome. *Cell Mol Immunol*. 2017 Jan;14(1):65-79. doi: 10.1038/cmi.2016.29. Epub 2016 Jun 27.
9. Kang TJ, Lee GS, Kim SK, Jin SH, Chae GT. Comparison of two mice strains, A/J and C57BL/6, in caspase-1 activity and IL-1 β secretion of macrophage to *Micobacterium leprae* infection. *Mediators Inflamm*. 2010;2010: 1-5.
10. Costa RD1, Mendonça VA, Lyon S, Penido RA, Costa AM, Costa MD, Nishi MP, Teixeira MM, Teixeira AL, Antunes CM. Evaluation of the expression of interleukin 1 beta (IL-1beta) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in leprosy patients. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2008;41 Suppl 2:99-103.
11. Takano K, Kondo A, Kurose M, Yamashita K, Nomura K, Obata K, Murayama K, Ito F, Himi T. Expression of Inflammasome-Associated Proteins in Human Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Adv Otorhinolaryngol*. 2016;77:98-104. doi: 10.1159/000441884.
12. Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasome. *Nature Reviews Immunology*. 2013;13; 397-411.

3 – FOLHA DE APROVAÇÃO**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS****PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA****FOLHA DE APROVAÇÃO****Associação de biomarcadores do inflamassoma às diferentes formas imunopatológicas da hanseníase****ANA LUISA GOMES MENDES**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 22 de fevereiro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Marcelo Antonio Pascoal Xavier - Orientador

UFMG

Prof(a). Mauro Martins Teixeira

UFMG

Profº Cleverton Teixeira Soares

Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru

Belo Horizonte, 22 de fevereiro de 2017.