



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

PRYSCILLA LAYANNA BEZERRA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO *in situ* DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E
DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1-ALPHA NAS LESÕES DE PACIENTES
COM HANSENÍASE.**

Recife

2019

PRYSCILLA LAYANNA BEZERRA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO *in situ* DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E
DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1-*ALPHA* NAS LESÕES DE PACIENTES
COM HANSENÍASE.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Tropical da
Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para a obtenção do
título de Mestra em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical

Orientador: Prof^a Dr^a. Vláudia Maria Assis Costa

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Francisca Janaína Soares Rocha

Recife

2019

Catálogo na fonte:

Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4:1790

C331a Carvalho, Priscilla Layanna Bezerra de
Avaliação *in situ* do fator de crescimento endotelial vascular e do
fator induzido por hipóxia 1-*alpha* nas lesões de pacientes com
hanseníase/ Priscilla Layanna Bezerra de Carvalho. – 2019.
79 f.; il.

Orientadora: Vláudia Maria Assis Costa.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em
Medicina Tropical. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Angiogênese. 2. Hanseníase. 3. Hipóxia. 4. Pele I. Costa,
Vláudia Maria Assis (orientadora). II. Título.

616.9792 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2019 - 230)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

PRYSCILLA LAYANNA BEZERRA DE CARVALHO

**AVALIAÇÃO *in situ* DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E
DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1-ALPHA NAS LESÕES DE PACIENTES
COM HANSENÍASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Medicina Tropical.

Aprovado em: 30/08/2019.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Virginia Maria Barros de Lorena (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade e condições de concluir o mestrado.

Agradeço aos meus familiares por terem me ajudado em todo processo, com apoio financeiro e psicológico, e por terem entendido meu afastamento: minha mãe, tias, tios, avós, primos e primas, irmãos.

Agradeço a todos os meus amigos que torceram por mim e que confiaram na minha capacidade, em especial a Caroline, Ruanne, Marília, Rodrigo, Renata, Raylene, Ítalo, Jennyffer, Cleide, Jefferson, Ana Cláudia.

Agradeço ao meu noivo, João Batista, pela paciência com meus problemas durante todo processo e por entender minha ausência em alguns finais de semana;

Agradeço aos colegas de turma do mestrado por compartilharmos todos os momentos bons e não tão bons assim. Em especial à Regina Coeli, Diego, Glauco, Tiago, Regina Athalys, Danylo, Ayana, Andreia, Conceição, Kaliene e Roberto.

Agradeço a Eduardo Costa, fotógrafo por ter me ajudado com a formar as figuras dos resultados deste trabalho.

Agradeço a todos os professores e professoras do programa pelo conhecimento passado e pela disponibilidade de sempre ajudar.

Agradeço às minhas orientadoras Vláudia Maria e Francisca Janaína por todo apoio em todo processo do mestrado, pela ajuda e incentivo em continuar o projeto, por todo conhecimento passado e por ter me mostrado que eu posso ir além.

Agradeço a todos os colaboradores do projeto, eles foram essenciais para todo o andamento: Drº Fábio Lopes, Drª Selma Giorgio, Eunice Santana, Renê, Profª Drª Isvânia.

Agradeço ao Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da UFPE por ter disponibilizado as amostras para que o projeto pudesse ter continuidade.

Agradeço ao Instituto Aggeu Magalhães e a Universidade de Campinas (UNICAMP) pela infraestrutura disponibilizada.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A hanseníase é uma doença dermatológica, granulomatosa crônica, que acomete pele e nervos periféricos. A hanseníase acomete países onde as condições socioeconômicas são precárias, sendo o Brasil o segundo país no *ranking* mundial na detecção de novos casos ficando atrás apenas da Índia. No Brasil, os maiores números de novos casos estão nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste. Estudos com o fator de crescimento endotelial vascular, fator induzido por hipóxia 1-*alpha*, e a enzima óxido nítrico sintase induzível podem ajudar no monitoramento do curso clínico de pacientes com hanseníase. O HIF-1 *alpha* está presente em situações de hipóxia e ativa a expressão de diversas moléculas como o iNOS e o VEGF. O presente estudo buscou caracterizar *in situ* os marcadores HIF-1 α , VEGF e iNOS em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase (vichorwiana (VV), tuberculoide (TT), indeterminada, e reacional tipo 2). Foram analisadas 23 biópsias de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase de um hospital público federal de Recife, Pernambuco. Utilizou-se a técnica de imuno-histoquímica para avaliação da expressão das proteínas. Foi feita a marcação qualitativa para HIF-1 α , VEGF e iNOS. Verificamos que todas as amostras com a forma clínica TT foram positivas para HIF-1 α , enquanto as amostras com a forma clínica VV foram negativas ($p < 0,01$). O iNOS foi positivo em 80% das amostras TT e negativos em todas as amostras VV. O VEGF foi positivo nas formas TT e VV. Os achados sugerem que o HIF-1 α e o iNOS presentes na forma tuberculóide da hanseníase pode estar relacionado a um fator de proteção da doença e a morbidade controlada nesses pacientes.

Palavras-chave: Angiogênese. Hanseníase. Hipóxia. Pele.

ABSTRACT

Leprosy is a dermatological disease, chronic granulomatous that affects the skin and peripheral nerves. Leprosy affects countries where socioeconomic conditions are precarious, with Brazil being the second country in the worldwide ranking in detecting new cases behind only India. In Brazil, the largest numbers of new cases are in the north, Northeast and Midwest regions. Studies with the vascular endothelial growth factor, a factor induced by hypoxia 1-alpha, and the inducible nitric oxide synthase enzyme can help to monitor the clinical course of leprosy patients. The HIF-1 alpha is present in hypoxia situations and activates the expression of several molecules such as iNOS and VEGF. The present study aimed to characterize in situ the markers HIF-1 α , VEGF and iNOS in cutaneous lesions of patients with leprosy (vichorwiana (VV), tuberculoid (TT), undetermined, and type 2 reactional). We analyzed 23 biopsies of cutaneous lesions of leprosy patients from a federal public hospital in Recife, Pernambuco. The immunohistochemistry technique was used to evaluate the expression of proteins. Qualitative marking was performed for HIF-1 α , VEGF and iNOS. We verified that all samples with the TT clinical form were positive for HIF-1 α , while the samples with the VV clinical form were negative ($p = < 0.01$). The iNOS was positive in 80% of the TT and negative samples in all VV samples. The VEGF was positive in the TT and VV forms. The findings suggest that the HIF-1 α and iNOS present in the tuberculoid form of leprosy may be related to a disease protection factor and morbidity and controlled in these patients.

Keywords: Angiogenesis. Leprosy. Hypoxia. Skin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 –	Taxa de detecção geral e taxa de detecção em menores de 15 anos de casos de hanseníase.....	15
Figura 2 –	Taxa de detecção de hanseníase na população geral.....	17
Figura 3 –	Mecanismos reguladores de HIF-1 α	25

Artigo

Figura 4 –	Expressão de HIF-1 α em lesões cutâneas de hanseníase tuberculóide (A) e controle negativo sem expressão de HIF-1 α (B); Expressão de iNOS em lesão cutânea de hanseníase tuberculóide (C) e controle negativo sem expressão de iNOS (D); Expressão de VEGF em lesões cutâneas de hanseníase vichorwiana (E) e controle negativo sem expressão para VEGF (F). As secções A a D (x40) foram coradas com imunoperoxidase e com hematoxilina. As secções E e F (x 40) foram coradas com imunoperoxidase e com hematoxilina e eosina.....	44
------------	---	----

LISTA DE TABELAS

Resultados

Tabela 1 –	Caracterização dos pacientes quanto à idade.....	42
Tabela 2 –	Total de casos e porcentagem das variáveis analisadas.....	42
Tabela 3 –	Associações envolvendo a forma clínica.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

D	Dimorfo
DAB	Diaminobenzidina
DC	Células Dendríticas
DD	Dimorfo-Dimorfo
DT	Dimorfo-Tuberculóide
DTR	Dimorfo-Tuberculóide Reacional
DV	Dimorfo-Virchowiano
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
FIH1	Fator Inibidor de HIF
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HIF-1 α	Fator Induzido por Hipóxia 1- <i>alpha</i>
I	Indeterminado
IB	Índice Baciloscópico
IFN- γ	Interferon-gama
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
KDR	Receptor de Domínio de Inserção Quinase
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania donovani</i>
<i>L.major</i>	<i>Leishmania major</i>
MB	Multibacilares
MS	Ministério da Saúde
<i>M. Leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
NF- κ B	<i>Factor Nuclear kappa B</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase

OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PB	Paucibacilares
PHD	Proil hidroxilase de HIF
PQT	Poliquimioterapia
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RR	Reação Hansênica tipo I ou reversa
SVS	Secretaria de Vigilância da Saúde
Th	<i>T Helper (lymphocyte)</i>
TLR	<i>Toll-Like Receptor</i>
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TR	Tuberculóide Reacional
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
V	Virchowiana
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
VV	Virchowiana-Virchowiana
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	Aspectos epidemiológicos da hanseníase.....	14
2.2	Agente etiológico.....	17
2.3	Classificação clínica da hanseníase	18
2.4	Reações hansênicas	19
2.5	Diagnóstico da hanseníase	21
2.6	Aspectos imunes da hanseníase.....	22
2.7	Fator induzido por hipóxia 1 alpha (HIF-1 alpha)	24
2.8	Enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)	26
2.9	Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).....	28
3	JUSTIFICATIVA.....	30
4	PERGUNTA CONDUTORA.....	32
5	OBJETIVOS	33
5.1	Objetivo geral.....	33
5.2	Objetivos Específicos	33
6	MATERIAIS E MÉTODOS	34
6.1	População e local de estudo.....	34
6.2	Imunohistoquímica.....	34
6.3	Análise estatística.....	36
7	RESULTADOS	37
7.1	ARTIGO 1 - Avaliação <i>in situ</i> dos marcadores VEGF, HIF-1a e iNOS em biópsias de pele de pacientes com hanseníase.....	37
8	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	APÊNDICE A – ARTIGO.....	61
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	78

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é uma doença granulomatosa crônica, dermatológica, neurológica, imunológica e sistêmica e apresenta várias manifestações clínicas, que acomete preferencialmente, pele e nervos periféricos, sendo causada pelo *Mycobacterium leprae*, um bacilo intracelular obrigatório e álcool ácido resistente (SUGITA, 1995; MENDONÇA et al, 2008). A multiplicação do bacilo acontece de forma lenta e a doença está relacionada a uma resposta imune deficiente do hospedeiro (VAZQUÉZ et al, 2014).

Os pacientes podem ser classificados em indeterminados, vichorwianos, tuberculoídes, dimorfos (dimorfo-virchowiano, dimorfo-tuberculoíde e dimorfo-dimorfo), ou ainda de forma simplificada pela OMS em paucibacilares e multibacilares (MADRID, 1953; RIDLEY E JOPLING, 1966; WHO, 1982).

A doença afeta os países mais pobres, acometendo, sobretudo, a população menos favorecida e sua transmissão ocorre, principalmente, através das vias aéreas superiores ou através da pele lesionada (ARAÚJO, 2005). Quanto a taxa de detecção de novos casos, o Brasil ocupa o segundo lugar no *hanking* mundial, sendo as regiões Norte, Nordeste e Centro-oeste as mais acometidas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Em 2018, a taxa de prevalência de hanseníase no Brasil foi de 1,48 casos para cada 10.000 habitantes, sendo no nordeste 2,15 casos/10 mil habitantes e em Pernambuco 2,50 casos/10 mil habitantes (SINAN, 2019).

Estudos com o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator induzido por hipóxia 1-*alpha* (HIF-1 α) e a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em material de lesões humanas podem ajudar no monitoramento do curso clínico dos pacientes com hanseníase (vichorwiana, tuberculoíde, dimorfo).

O HIF-1 α está presente em situações de hipóxia nos tecidos, sua ativação é importante para a capacidade bactericida dos fagócitos, além disso, regula a produção de diversas enzimas, entre elas a iNOS, que pode ter ação protetora ou nociva para o organismo (CARDOSO et al, 2015; ZINKERNAGEL, JOHNSON, NIZET, 2007; SINGH et al, 2012; GORDAN, SIMON, 2007).

Elks et. al. (2013) manipularam a sinalização de HIF-1 α em larvas de *zebrafish* infectadas pelo *Micobacterium marinum*, buscando compreender a capacidade que o hospedeiro tem em combater essa infecção. Esses autores identificaram o HIF-1 α nas

fases iniciais da infecção pela micobactéria e perceberam que houve uma diminuição significativa da carga bacteriana no início da infecção pelo HIF-1 α via iNOS (ELKS et al, 2013). Em algumas doenças como na leishmaniose, autores descreveram que o HIF-1 α pode atuar como um fator protetor na leishmaniose cutânea ou prejudicial na leishmaniose visceral (SCHATZ, NEUBERT, RIEGER, JANTSCH, 2018).

Como forma de defesa do organismo contra a hanseníase, há produção de diversas substâncias tóxicas pelos macrófagos, entre elas o iNOS (QUARESMA et al, 2010). Situações onde ocorre a ativação do HIF e também do fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α), e interferon *gamma* (IFN γ) aumentam a produção de iNOS regulando à resposta a inflamação (SCHON et al, 2001; HELLWIG-BÜRGE et al, 2005).

Um estudo mostrou imunomarcagem de iNOS fortemente positiva em macrófagos nos granulomas, bem como sua presença em biópsias de pele de pacientes reacionais tipo 1 (RR) (SCHON et al, 2001). Lockwood et al, 2011, detectou uma produção elevada de iNOS pacientes com hanseníase dimorfo-tuberculóide (DT) em comparação a pacientes com hanseníase vichorwiana (VV), este achado referente-se a capacidade do iNOS ser um agente bactericida ou bacteriostático (LOCKWOOD et al, 2011).

O VEGF é um agente angiogênico que está envolvido no aumento da permeabilidade vascular (NIZET, JOHNSON, 2009) e, na inflamação granulomatosa, promove a migração e ativação de macrófagos para o sítio infeccioso (NOGUEIRA, LATINI, NOGUEIRA, 2016).

Fiallo et. al. (2002), analisaram biópsias de pele de pacientes com reação hanseníase tipo 1 (RR) comparadas a casos de hanseníase não-reacional e observaram um aumento da expressão de VEGF e seu receptor KDR (receptor de domínio de inserção de quinase) em células endoteliais e em células dendríticas na RR, sugerindo que essas células podem ser sítios de armazenamento do VEGF e sua liberação implica na transmissão do sinal no início da RR. Entretanto, faltam estudos que relacionem a expressão do VEGF, assim como do HIF-1 α , em pacientes com hanseníase não-reacional e o risco de desenvolver as formas reacionais da hanseníase tipo 1 e tipo 2 (FIALLO, CLAPASSON, FAVRE, PESCE, 2002).

Diante do exposto, este estudo avaliou *in situ* o papel do HIF1 α , VEGF e iNOS em lesões de hanseníase (vichorwiana, tuberculoide, indeterminada e reacional tipo 2). Foram avaliadas biópsias de pele coletadas entre 2014 até 2018 do Serviço de Dermatologia de um hospital público federal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da hanseníase

A hanseníase é relatada principalmente onde as condições econômicas, sociais e ambientais são precárias. O Brasil ocupa a segunda posição no *ranking* mundial na detecção de novos casos ficando atrás apenas da Índia, sendo a doença considerada um grave problema de saúde pública no país (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). No Brasil, novos casos da doença são relatados em todos os Estados, sendo em maior número nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, sendo estas consideradas áreas importantes de transmissão da doença. A elevada endemicidade favorece a transmissão da doença, prejudicando a sua interrupção e a diminuição de novos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

O Brasil segue as recomendações da Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020 da Organização Mundial de Saúde (OMS), onde o seu objetivo imediato é reduzir a carga da doença de forma global e local, tendo como alicerce três grandes pilares: o fortalecimento do controle, coordenação e da parceria governamental, o combate da hanseníase e suas complicações, e promover a inclusão social através do combate à discriminação (OMS, 2017).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabelece uma meta para a eliminação da doença nos países de menos de 1,0 caso/10.000 habitantes (ARAÚJO 2005). A redução dos casos de hanseníase, baseia-se na detecção precoce de novos casos da doença, tratamento eficaz e cura dos casos diagnosticados, com objetivo de prevenir as deformações físicas provocadas pelo agravamento da doença (PORTAL BRASIL, 2017).

Dos indivíduos que tiveram contato com o *M. leprae*, estima-se que 95% sejam resistentes a infecção, e dentre os casos de susceptibilidade que totalizam os 5% restantes, pode haver manifestação da doença de diferentes formas podendo estar relacionado a fatores como sexo, idade, genética, condições socioeconômicas e ambientais (SECRETARIA DA SAÚDE, 2019).

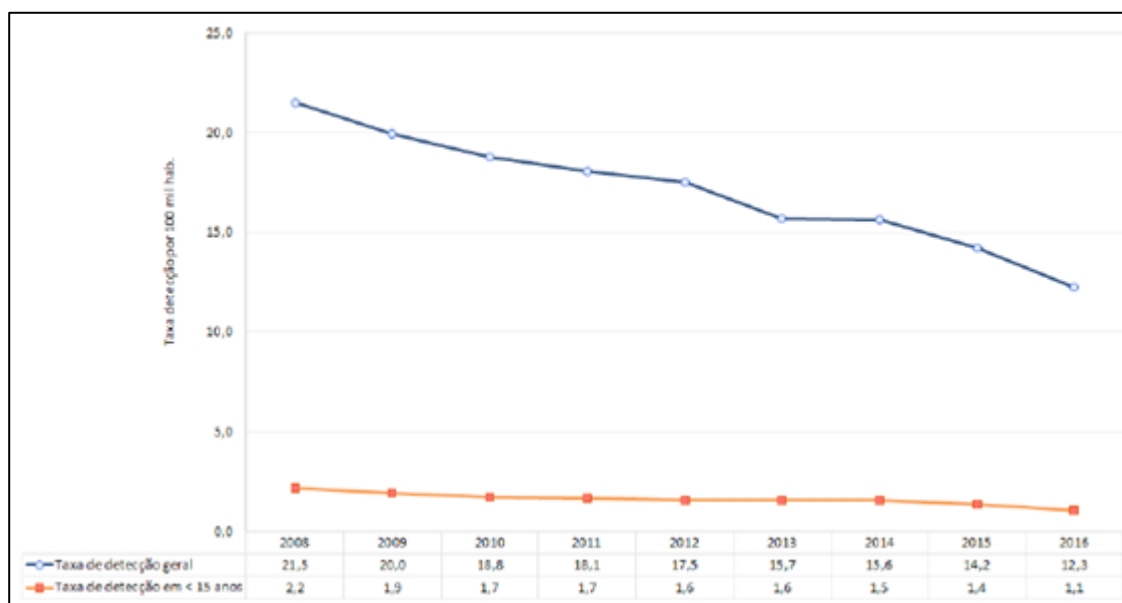
Em 2015, numa publicação feita pela OMS que envolveu 121 países, mostrou que houve uma taxa de detecção correspondente a 3,0 casos/10.000 habitantes em 2014 (WHO, 2015). No Brasil, houve uma redução de 34,1% referente a novos casos diagnosticados no período entre 2006 e 2015 (PORTAL BRASIL, 2017).

A Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) apresentou a estratégia global para eliminação de hanseníase 2016-2020, e segundo a organização, o Brasil é o único país das Américas que não conseguiu eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, sendo responsável por 94% dos novos casos da doença nas Américas (OPAS/OMS, 2017).

O Brasil apresentou em 2018 uma taxa de prevalência de 1,48 casos por 10.000 habitantes: sendo 3,34 no Norte, 2,15 no Nordeste (2,50 em Pernambuco), 0,46 no Sudeste, 0,30 no Sul e 4,54 no Centro-Oeste. Pernambuco em 2016 registrou 1856 casos novos de hanseníase, e em 2018, 2263 novos casos da doença. O percentual de cura destes pacientes em Pernambuco em 2018 é de 80,5 % (SINAN, 2017; SINAN, 2019).

Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, 2018, foram notificados no Brasil, no período de 2008 a 2016, 301.322 casos de hanseníase, sendo 21.666 (7,2%) correspondentes aos menores de 15 anos de idade. Neste mesmo período, a taxa de detecção de casos novos caiu 43%, saindo de 21,5 para 12,3/100 mil habitantes e, entre os menores de 15 anos, a queda foi de 50,7%, passando 2,1 para 1,1/100 mil habitantes (Figura 1). (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Figura 1 – Taxa de detecção geral e taxa de detecção em menores de 15 anos de casos de hanseníase.

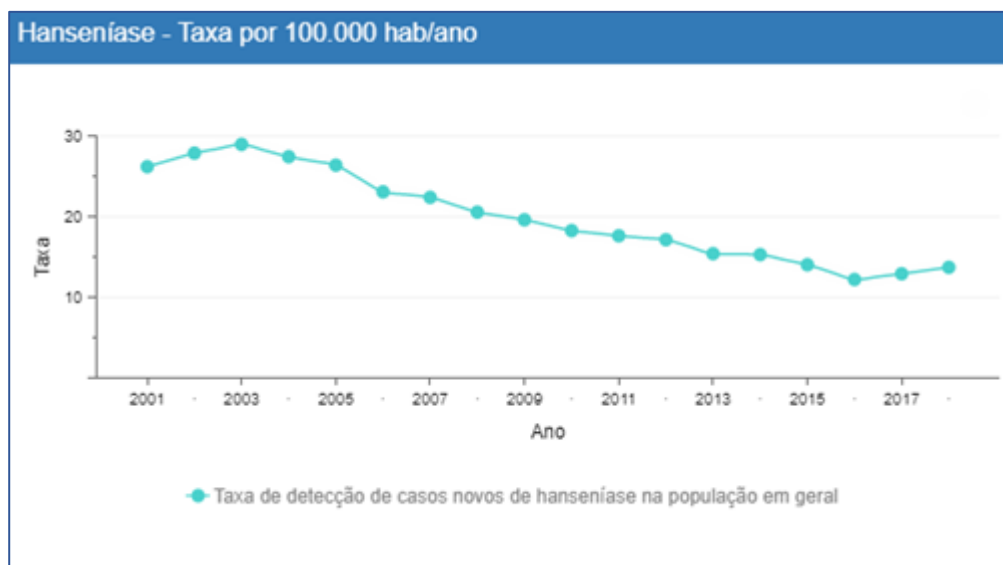


Fonte: SINAN, 2017.

No período que compreende 2012 a 2016, foram diagnosticados no Brasil 151.764 casos novos de hanseníase, equivalendo-se a uma taxa média de detecção de 14,97/100 mil habitantes. Destes, 84.447 casos novos acometeram o sexo masculino, correspondendo a um percentual de 55,6%. Ainda nesse período, observou-se que na população masculina a taxa de detecção de novos casos foi maior que na população feminina, especialmente a partir dos 15 anos de idade. Os casos multibacilares (MB) foram prevalentes na população masculina (62,7%), enquanto os paucibacilares (PB) prevaleceram na população feminina (58,6%). (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A análise das macrorregiões de 2012 a 2016 mostrou que o Centro-Oeste (37,27/100 mil hab.) e o Norte (34,26/100 mil hab.) são as regiões com as maiores taxas de detecção geral de casos novos de hanseníase no país. As regiões Sul (3,75 por 100 mil habitantes) e Sudeste (5,31 por 100 mil habitantes) apresentaram as menores taxas. Quanto a etnia, observou-se que, entre os casos novos diagnosticados no país, os declarados pretos/pardos apresentaram o maior índice da doença totalizando 71,7%, enquanto os declarados brancos totalizaram 26,8%, amarelos 0,9% e indígenas 0,4%. Quanto a escolaridade, o segmento analfabeto/ensino fundamental incompleto, totalizou 55% das notificações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A taxa de detecção de novos casos no período entre 2001 e 2017 mostra uma redução dos novos casos, onde em 2001 a taxa era de 26,22/100 mil habitantes e em 2017 era de 13,74/100 mil habitantes (Figura 2) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Figura 2 – Taxa de detecção de hanseníase na população geral.

Fonte: SINAN / IBGE NOTAS: dados atualizados em 28/05/2019,

2.2 Agente etiológico

A literatura científica oficial denomina a doença de lepra, contudo no Brasil esta nomenclatura tornou-se estigmatizante para os doentes, tendo sido substituída pelo termo hanseníase, tendo recebido esta denominação pelo médico norueguês Gerhard Amauer Hansen, descobridor do agente etiológico, em 28 de fevereiro de 1873 (GETZ, 1958).

O *Mycobacterium leprae*, ou bacilo de Hansen, é o agente causador da doença hanseníase. Considerado um patógeno álcool-ácido resistente, gram-positivo, intracelular obrigatório, que tem afinidade por células da pele e nervos periféricos, tem multiplicação lenta que dura em média 11 a 16 dias, o homem é considerado a única fonte de infecção da doença, possui característica hidrofóbica devido a presença do ácido micólico em sua parede celular. O bacilo possui alta infectividade e baixa patogenicidade, ou seja, possui capacidade de infectar muitas pessoas, mas são poucas as adoecem. A doença tem um período de incubação longo, de 2 a 7 anos e atinge pessoas de todas as idades, não fazendo distinção de sexo (SUGITA, 1995; OPROMOLLA e cols, 2000; MENDONÇA et al, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; VAZQUÉZ et al, 2014).

A transmissão acontece através do contato direto com a pessoa não tratada portadora do bacilo de Hansen, esta elimina para o ambiente o bacilo contagiando outras pessoas susceptíveis. A principal porta de entrada do bacilo são as vias aéreas,

e autores descrevem também o contato através de lesões na pele com pacientes portadores da doença. Os pacientes paucibacilares (PB) não são considerações fontes de transmissão da doença, visto a baixa carga bacilar que eles apresentam, no entanto, pacientes multibacilares (MB) são a principal fonte de infecção e de transmissão da doença para o meio exterior (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2002; ARAÚJO, 2005).

2.3 Classificação clínica da hanseníase

A classificação clínica da hanseníase segue os critérios estabelecidos em Madrid, que considera dois polos estáveis e opostos, o virchowiano polar e o tuberculóide polar e dois grupos instáveis, o indeterminado (I) e o dimorfo (D) que evoluíram para um destes polos estáveis (MADRID, 1953).

Ridley e Jopling em 1966 dividiram os portadores de hanseníase em virchowianos polares (VV), tuberculóides polares (TT), e subdividiu o grupo dimorfo em dimorfos-virchowianos (DV), dimorfos-tuberculóides (DT) e dimorfos-dimorfos (DD). A forma indeterminada (I) representaria a fase de infecção inicial com manifestações peculiares e restritas à pele, que pode evoluir para qualquer uma das formas definidas por Ridley e Jopling (RIDLEY, JOPLING, 1966)

As formas polares são representadas pelos indivíduos VV e TT, enquanto os indeterminados e dimorfos são imunologicamente instáveis, podendo apresentar características que se aproximem do polo virchowiano, ou que se aproximem do polo tuberculóide. Os dimorfos apresentam manifestações de ambos os grupos polares e localizam-se no meio do espectro (NETO, 2012).

A OMS, em 1982 propôs uma classificação simplificada, para facilitar a operacionalização do tratamento. Desta forma classificou de acordo com o índice baciloscópico, em multibacilar (MB) ou paucibacilar (PB). Em 1988, estabeleceu critérios clínicos, considerando paucibacilares casos com até cinco lesões cutâneas e/ou um tronco nervoso e multibacilares casos com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido (RODRIGUES, LOCKWOOD, 2011; MOSCHELLA, 2004; WHO, 1982).

2.4 Reações hansênicas

As reações hansênicas, podem ser definidas como estados clínicos inflamatórios agudos, relacionados com uma rápida mudança na resposta imunológica do hospedeiro, que interrompe o curso crônico usual e a estabilidade clínica de pacientes com hanseníase. Trata-se de resposta imunológica frente aos antígenos bacilares do *M. leprae*. Todas as formas clínicas de hanseníase podem desenvolver reações hansênicas, menos a forma indeterminada (MASTRANGELO et al, 2008).

As reações hansênicas podem acontecer antes da poliquimioterapia (10% dos pacientes), durante a poliquimioterapia (50% dos pacientes) e após a poliquimioterapia (30%) dos pacientes. Classicamente são divididas em reação do tipo 1 ou reação reversa (RR) e reação do tipo 2 ou eritema nodoso hansênico (ENH). Vários fatores podem ser considerados precipitantes para a ocorrência destes surtos reacionais: gravidez, parto, puberdade, infecções intercorrentes, em especial a tuberculose, vacinações, cirurgia, medicamentos iodados (por exemplo, o iodeto de potássio) além do estresse físico e emocional. A reação do tipo 1 acontece por exacerbação da imunidade celular e clinicamente corresponde também a uma exacerbação das lesões pré-existentes ou mesmo o surgimento de novas lesões que passam a assumir aspectos inflamatórios: eritema, edema aumento da temperatura local e em algumas ocasiões, hiperestesia que pode ser traduzida por sensação dolorosa paradoxal. Acomete preferencialmente os indivíduos tuberculóides, dimorfos-tuberculóides e dimorfos-dimorfos, podendo levar a uma melhora do quadro clínico ou levar à grave comprometimento neural e à instalação súbita de incapacidades permanentes. Podem perdurar durante meses, até anos (TALHARI et al, 2006).

Análises de biópsias antes, durante e após a sua ocorrência, em estudos conduzidos por Ridley e Radia (1981), em 12 indivíduos dimorfos, permitiram subdividir as reações hansênicas tipo 1 em *up-grading* quando a ocorrência do fenômeno foi acompanhada por decréscimo do índice baciloscópico em relação ao inicial e o estudo histopatológico após a ocorrência do surto reacional evidenciou que as lesões passaram apresentar padrões semelhantes à histopatologia dos indivíduos tuberculóides; e em *down-grading*, quando ocorre piora do índice baciloscópico e a

biópsia pós-reacional exibe histopatologia tipicamente dimorfa, alternando entre padrões tuberculóides e virchowianos (LASTORIA, ABREU, 2014; NERY et al, 2006).

As reações hansênicas do tipo 2 apresentam-se em três variantes clínicas: o eritema nodoso hansênico (ENH), a reação eritema-polimorfo-like e o fenômeno de Lúcio. No ENH, ocorre o aparecimento de nódulos eritematosos ou purpúricos, dolorosos, que se disseminam pelo corpo, e tendem a uma distribuição simétrica nos membros inferiores e superiores (LASTORIA, ABREU, 2014; NERY et al, 2006).

As lesões cutâneas na reação eritema polimorfo-like, apresentam-se menos nodulares quando comparadas a do eritema polimorfo e correspondem a placas e máculas eritematosas ou purpúricas localizadas principalmente em face, tronco e extremidades, podendo desenvolver vesículas, bolhas e ulcerar e necrotizar (NOGUEIRA, FLEURY, ARRUDA, 1995).

O fenômeno de Lúcio ocorre principalmente na forma de hanseníase descrita por Rafael Lúcio e Ignacio Alvarado em 1852, no México, sendo denominada de hanseníase de Lúcio. Pode ocorrer também em outras formas mais graves de hanseníase virchowiana. Trata-se de forma difusa e peculiar de hanseníase com altos índices baciloscópicos apresentados pelos pacientes que são completamente anérgicos imunologicamente. As lesões cutâneas apresentam-se como várias manchas purpúricas e dolorosas e bolhas hemorrágicas que tendem a evoluir para lesões necróticas e ulceradas (CUEVAS et al, 2007).

As ulcerações apresentam bordos irregulares e podem envolver deixando cicatrizes atróficas. Histopatologicamente encontram-se áreas de diversos infartos cutâneos caracterizada por uma intensa vasculite necrotizante de vasos capilares e artérias de médio a grande calibre na derme e no panículo adiposo (SOUZA, 1951).

Wemambu et al, 1969, demonstraram o primeiro mecanismo imunológico para as reações hansênicas do tipo 2, onde identificaram o depósito de imunoglobulinas e de frações do sistema complemento nas paredes dos vasos de lesões de eritema nodoso, considerada a principal manifestação deste estado reacional (WEMAMBU et al, 1969). No entanto, outros autores perceberam a deposição de imunocomplexos extra-vasculares como o resultado da ruptura de pequenos granulomas virchowianos. Mais tarde, evidenciou-se que este depósito de imunocomplexos está presente tanto no interior dos vasos quanto nos tecidos, a depender da intensidade do processo inflamatório (NOGUEIRA, 1995).

2.5 Diagnóstico da hanseníase

Desde 1988, a OMS define como um caso de hanseníase, uma pessoa que apresente os seguintes sinais clínicos da doença: a) lesão (ões) de pele com alteração de sensibilidade; b) acometimento de nervo (s) com espessamento neural; c) baciloscopia positiva para *M. leprae* (BRASIL, 2002). Os exames laboratoriais disponíveis auxiliam no diagnóstico, podendo destacar:

- 1) Baciloscopia: pesquisa de bacilos realizada em material colhido nos lóbulos auriculares direito e esquerdo, cotovelo direito e em lesão de hanseníase. Pacientes que não apresentam lesões visíveis devem incluir a coleta no cotovelo esquerdo. O esfregaço é corado pelo método de Ziehl-Neelsen a frio e o a positividade se dá pelo encontro de bacilos em uma avaliação quantitativa proposta por Ridley em 1962, fundamentada em uma escala logarítmica com variação entre 0 e 6. Nos pacientes com suspeita de recidiva e resistência medicamentosa a baciloscopia permite ainda determinar o índice morfológico, onde os bacilos apresentam-se íntegros (forma viável, define a doença ativa), fragmentados ou granulados (BRASIL, 2010).
- 2) Reação de Mitsuda: avalia a capacidade lisogênica dos macrófagos. Útil para avaliar o estado de relativa resistência ao *M. leprae*. É realizado mediante a injeção intradérmica de 0,1ml de lepromina, sendo o antígeno de Mitsuda-Hayashi o mais utilizado. A leitura é realizada em duas etapas sucessivas onde na primeira ou reação de Fernandez, verifica-se a formação do tuberculínico após a injeção antigênica, atingindo seu pico em 48-72h. A segunda fase ou reação de Mitsuda propriamente dita, é geralmente lida após 3 semanas com critérios de avaliação que levam em consideração o tamanho, aspecto e evolução da infiltração, sendo interpretada como a) Reação negativa (-): ausência de infiltração; b) Reação duvidosa (+/-): infiltrado < 3mm; c) Reação fracamente positiva (+): infiltrado de 3-5mm; d) Reação positiva (++) : infiltrado com mais de 5mm; e) Reação fortemente positiva (+++): quando ocorre ulceração (BEIGUELMAN, QUAGLIATO, 1964; MIYAWAKI, 2008).

A reação de Mitsuda pode ser positiva em áreas não-endêmicas, em pacientes sem histórico de contato prévio com o bacilo, não sendo possível, desta forma relacionar a sua positividade à exposição pregressa. Entretanto, nos doentes de hanseníase a negatividade é indicativa de baixa resistência ao bacilo e o desenvolvimento de formas multibacilares, por outro lado a positividade indica certo

grau de resistência ao bacilo e está relacionada com indivíduos paucibacilares (BEIGUELMAN, QUAGLIATO, 1964).

2.6 Aspectos imunes da hanseníase

A resposta imune inata caracteriza-se por um mecanismo de defesa inespecífico, que apresenta ação contra diversos fatores de agressão e patógenos, independente da sua natureza. Apesar da resposta inespecífica frente aos patógenos, há diversos receptores presentes que são capazes de reconhecer moléculas presentes na superfície dos microrganismos, chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPS), estes por sua vez, são reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrões (PRR), o qual pode-se destacar os receptores do tipo Toll (TLRs) (CRUVINEL et al, 2010).

Os linfócitos T-helper (Th) se subdividem a depender do padrão das citocinas que será produzido e, conseqüentemente, apresentarão respostas efetoras distintas. As células Th1 produzem de forma abundante IL-2 e IFN- γ que auxiliam na ativação de fagócitos e na produção de anticorpos opsonizantes. A resposta Th1 está envolvida na indução das respostas inflamatórias na tuberculose e também auxilia no controle da replicação de microrganismos intracelulares. Os linfócitos Th2 tem papel fundamental na resposta imune humoral e as principais citocinas produzidas são a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 e auxilia na produção de anticorpos (MESQUITA et al, 2010).

As micobactérias apresentam em sua superfície PRR. As células do hospedeiro reconhecem os PRRs que se constituem na primeira detecção por parte do organismo frente à presença do *M. leprae*. As lipoproteínas do *M. leprae* são capazes de se ligarem aos receptores TLRs, especialmente os TLR2 (KRUTZIK, MODLIN, 2004). A expressão destes receptores está aumentada na presença de citocinas Th1 e inibida na presença de citocinas Th2 (IL4). A ativação dos TLRs leva a um aumento na produção de TNF- α como parte da resposta inflamatória aguda, e IL-12 que induz uma resposta adaptativa Th1 (KRUTZIK et al, 2003).

Na hanseníase, a forma tuberculóide tem a resposta imune mediada por linfócitos Th1 que expressam citocinas inflamatórias como TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-1 β . Na forma virchowiana, a resposta imune é mediada por linfócitos Th2 com expressão de citocinas supressoras, como IL-10, TGF- β , IL-4 e IL-13 (AARÃO et al., 2014; ABDALLAH et al., 2014; DE SOUSA et al, 2017).

A ativação destes receptores também leva indiretamente a expansão de células dendríticas (DC) que promovem a ativação de células T através da secreção de IL-12, e IL-15 e seus receptores levando a diferenciação de macrófagos (DEMANGEL, BRITTON, 2000; KRUTZIK et al, 2005).

A resposta mediada por Th1 e produção de interferon ($\text{IFN-}\gamma$) medeia mecanismos responsáveis pela eliminação do bacilo e, conseqüentemente, o controle da progressão da doença (BRIGHTBILL et al, 1999).

A imunidade adaptativa é estimulada pela exposição consecutiva ao antígeno e se caracteriza pela especificidade e memória adquirida frente ao microrganismo. É composta pelos linfócitos B (que vão produzir os anticorpos que reconhecem os antígenos) e T. Além disso possui dois tipos de resposta: 1) a imunidade humoral, que mediada pelos anticorpos produzidos pelas células B e é a principal linha de defesa contra patógenos extracelulares; 2) a imunidade celular, está é mediada pelas células T e estão envolvidas na destruição de patógenos intracelulares, seja pela destruição do patógeno propriamente dito ou pela destruição das células infectadas pelo mesmo, com o intuito de eliminar os reservatórios da infecção (ABBAS, LICHTMAM, PILLAI, 2015).

Na imunidade adaptativa as células T CD4^+ são predominantes tanto na resposta imune indutora como efetora. O predomínio de resposta imune celular ou humoral, frente à infecção pelo bacilo, pode influenciar a evolução da doença e estar associado, pelo menos em parte, com as manifestações clínicas e alterações teciduais observadas nos pacientes portadores das formas TT e VV, respectivamente (TALHARI et al, 2006).

As células T CD4^+ , são encontradas predominantemente em lesões cutâneas de pacientes TT, em contrapartida, as lesões cutâneas de pacientes VV, apresentam-se com uma maior proporção de células T CD8^+ . (YAMAMURA et al, 1992; KHANOLKAR-YOUNG, SNOWDON, LOCKWOOD, 1998). Nas infecções micobacterianas é evidente a formação de granulomas, que ajuda a reduzir e evitar que a infecção se dissemine. Nos granulomas, os macrófagos são abundantes e podem se adaptar a situações de hipóxia, evitando assim, a morte celular (CARDOSO et al, 2015).

Alguns pesquisadores têm avaliado a associação do perfil de citocinas com as características clínicas da doença. No entanto estes estudos têm demonstrado ser

conflitantes, o que dificulta estabelecer um bom biomarcador (SALGAME et al, 1991; YAMAMURA et al, 1992).

2.7 Fator induzido por hipóxia 1 alpha (HIF-1 alpha)

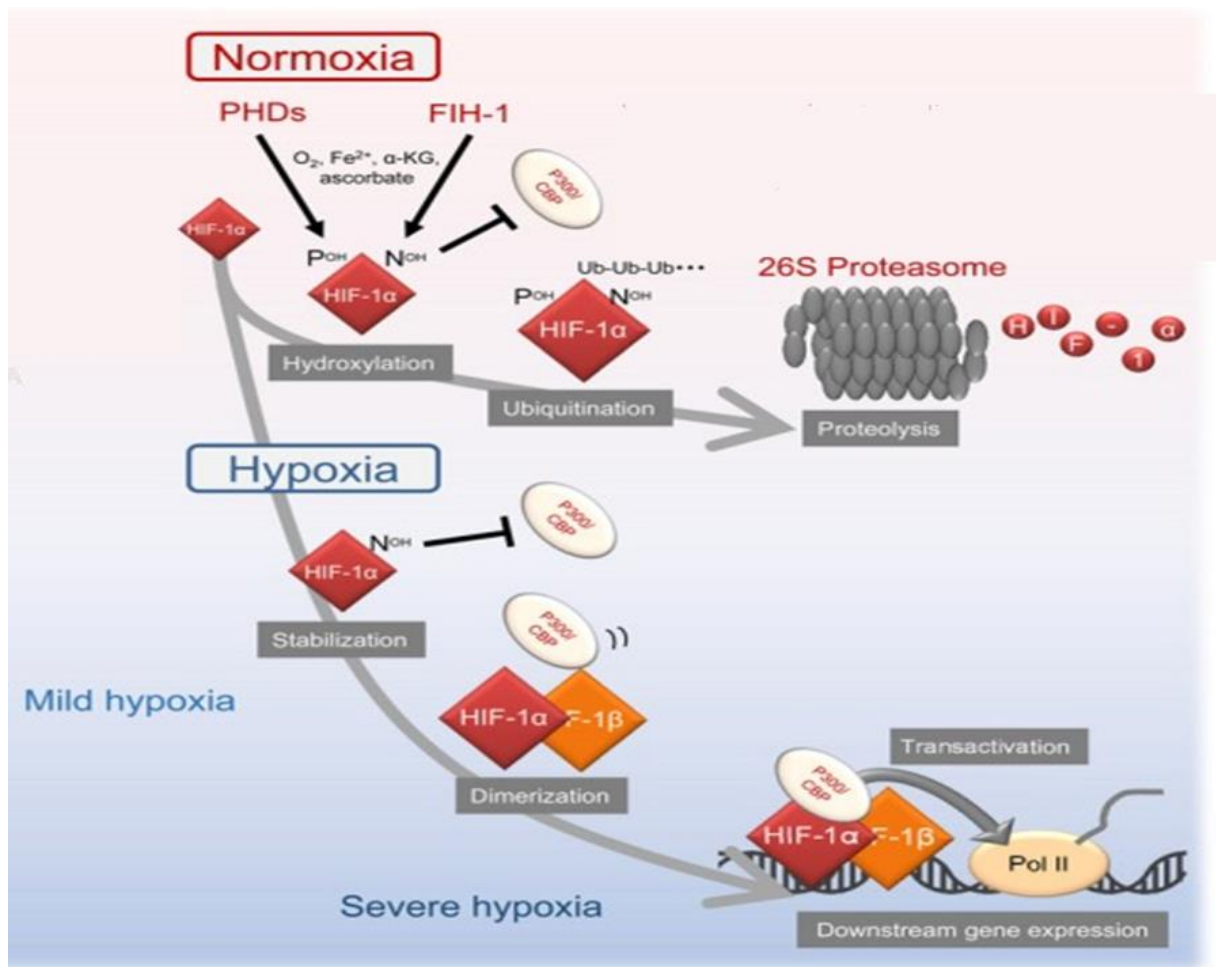
O fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) é o fator de transcrição fundamental durante a hipóxia e a sua ativação leva às células de mamíferos a se adaptarem a escassez de oxigênio (WERTH et. al, 2010).

O HIF-1 é um heterodímero composto por uma subunidade β , constitutivamente expressa no núcleo das células, e pela subunidade α regulada pela presença de oxigênio (WERTH et. al, 2010). O HIF-1 α está relacionado a situações de hipóxia e ativa genes que participam da eritropoiese, angiogênese, glicólise (FRAGA et al, 2012).

A inibição da atividade enzimática do domínio da prolil hidroxilase de HIF (PHD) e do fator inibidor de HIF (FIH1) através da hipóxia, é o mecanismo pelo qual ocorre a estabilização do HIF-1 α , ou seja, na presença de oxigênio a atividade de PHD e do FIH1 degrada HIF-1 α , já em condição de hipóxia o HIF-1 α é estabilizado e atividade da PHD é reduzida, e sua estabilização tem efeitos em vários processos no organismo como na homeostase, neovascularização, na inflamação, dentre outros (WERTH et al, 2010; MAJMUNDAR, WONG, SIMON, 2010). Além deste mecanismo, a atividade da PHD também é inibida através da quelação do ferro e consequentemente, ocorre a ativação do HIF-1 α (WERTH et al, 2010).

Às células mantém a degradação de HIF-1 α em situações não-hipóxicas, à medida que o oxigênio diminui e passa a ter uma condição de hipóxia, a degradação do HIF-1 α é inibida e sua expressão é aumentada (MANALO et al, 2005).

Figura 3 – Mecanismos reguladores de HIF-1 α .



Fonte: Adaptado de Koyasu, S., et al, 2018.

HIF-1 α está presente em diversos tecidos com inflamação e microambientes hipóxicos (GORDAN, SIMON, 2007). Quando um organismo é exposto às bactérias, o HIF-1 é vigorosamente estimulado desempenhando papel na regulação da produção de óxido nítrico e TNF por fagócitos (CARDOSO et al, 2015). A ativação do HIF-1 α é essencial para a capacidade bactericida dos fagócitos, produzindo várias moléculas efetoras da resposta imune do hospedeiro (ZINKERNAGEL, JOHNSON, NIZET, 2007; SINGH et al, 2012). A sinalização através da via HIF-1 α está envolvida na ativação de leucócitos e nos mecanismos de defesa do indivíduo infectado. A estabilização de HIF-1 α aumenta o tempo da função dos leucócitos em relação à resposta imune inata na lesão (ZINKERNAGEL, JOHNSON, NIZET, 2007; SINGH et al, 2012).

A expressão de HIF pode ter efeitos distintos na regulação imunológica a depender do tipo de célula (BHANDARI, NIZET, 2014). Um estudo comparou o efeito

do HIF-1 α em fagócitos mononucleares na leishmaniose cutânea induzida por *L.major* e na leishmaniose visceral e mostrou que o HIF-1 α atua como fator protetor na leishmaniose cutânea, enquanto que na leishmaniose visceral ele atuou como fator prejudicial (SCHATZ, NEUBERT, RIEGER, JANTSCH, 2018).

Outro estudo demonstrou que a ativação do HIF-1 α no macrófago é um fator protetor para o parasita intracelular *Leishmania donovani*, onde o crescimento intracelular do parasita foi favorecido na presença de HIF-1 α contrapondo-se a atividade prejudicial a outros patógenos como *Streptococcus pyogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* dentre outras bactérias. A infecção por *L. donovani* aumentou a transcrição de HIF-1 α e sua estabilização, bem como inibiu a atividade da PHD (SINGH, 2012).

Elks et al, (2013) manipularam a sinalização de HIF-1 α em *zebrafish* infectado com *Mycobacterium marinum* e perceberam que a estabilização do HIF-1 α nas fases iniciais da infecção no hospedeiro conseguiu diminuir a quantidade de bactérias através da ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (ELKS et al, 2013).

O HIF1 α tem sido recentemente associado ao controle da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* via indução de IFN γ . Os autores demonstraram uma correlação positiva entre iNOS e HIF-1 α , que amplifica a ativação de macrófagos. Além disto, o óxido nítrico (NO) neste modelo inibe via ativação de NF- κ B (*Factor Nuclear kappa B*), uma resposta hiper-inflamatória. Desta forma o NO teria atividade microbicida, porém limita os danos provocados pela inflamação (BRAVERMAN, STANLEY, 2017).

Wang et al, (2018) identificaram que a variante missense rs142179458 (c.1045G> A [p.Asp349Asn]) localizada no éxon 8 do HIF-1 α na região cromossômica 14q23.2, está fortemente relacionada a susceptibilidade à hanseníase, principalmente em indivíduos multibacilares de populações asiáticas (WANG et al, 2018).

2.8 Enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS)

O óxido nítrico (NO) é uma molécula de sinalização importante que regula vários processos fisiológicos e fisiopatológicos, como por exemplo, em doenças do sistema imunológico. Em distúrbios inflamatórios, o NO tem função citotóxica e sua produção é catalizada por enzimas chamadas de sintase de óxido nítrico (NOS) e pode-se citar pelo menos três isoformas diferentes: óxido nítrico sintase endotelial

(eNOS), óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS). A elevada produção de NO é catalisada pelo iNOS podendo apresentar efeitos protetores ou nocivos. O iNOS pode ser estimulado por citocinas imunoestimuladoras, liberação de produtos bacterianos ou infecção em células do endotélio, fígado, macrófagos e da musculatura lisa. Além dos efeitos protetores do iNOS, a sua inibição favorecer o tratamento de doenças inflamatórias (AKTAN, 2004).

Na hanseníase, os macrófagos secretam várias substâncias tóxicas para as células como forma de defesa do organismo, entre elas o iNOS, o TNF, dentre outras moléculas (QUARESMA et al, 2010). Em tecido inflamados, a ativação do HIF, pode aumentar a produção de NO, e a indução de iNOS pelo HIF representaria uma resposta positiva na regulação da inflamação (HELLWIG-BÜRGE et al, 2005). O TNF- α e o IFN- γ também estimulam a produção de iNOS. (SCHON et al, 2001). Um estudo mostrou imunomarcagem de iNOS na hanseníase dimorfa em macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, queratinócitos. O iNOS mostrou-se fortemente positivo em macrófagos nos granulomas. Também demonstraram a presença do iNOS em biópsias de pele de pacientes RR (SCHON et al, 2001).

Em um estudo feito por Belone, (2004), em 10 biópsias de lesões para cada grupo (TT, DT, TR e DTR), onde se propuseram a estudar a atividade dos macrófagos através da detecção de iNOS e evidenciaram expressão de iNOS em todos os grupos estudados, sendo que valores mais elevados foram encontrados nos TT. Também evidenciaram uma correlação positiva entre iNOS e células NK nos TT, sugerindo uma imunidade celular mais satisfatória contra o bacilo (BELONE, 2004).

Venturini, (2008), pesquisaram iNOS *in situ* em lesões cutâneas de 19 pacientes com hanseníase dimorfa por imunohistoquímica e verificaram sua expressão em células epitelióides, histiócitos e células gigantes multinucleadas presentes nos granulomas. A detecção de iNOS foi maior em pacientes DT com IB de 0 a 1+ (mostrando uma resposta imune eficaz contra o bacilo) do que em pacientes DV com IB de 4+ e a presença de TGF- β 1 e IL-10 em grande quantidade de células (mostrando uma resposta imune ineficaz e elevada carga bacilar) (VENTURINI, 2008).

Um estudo em biópsias de pele de pacientes com hanseníase, detectou iNOS em 78% das amostras analisadas, onde obtiveram níveis mais elevados em pacientes BT e mais baixos em pacientes VV, este achado pode estar associado a capacidade da iNOS ser um agente bactericida ou bacteriostático. (LOCKWOOD et al, 2011). Neste mesmo estudo, os autores acharam níveis elevados de TNF- α , TGF- β e iNOS

nas lesões de reação tipo 1 na pele. (LOCKWOOD et al, 2011). No entanto, De Sousa et al, 2017 mostraram um aumento da enzima iNOS na hanseníase virchowiana (DE SOUSA et al, 2017).

Pereira-Suárez et al, (2015), estudaram a co-expressão de Slc11a1 e iNOS em macrófagos infiltrantes (CD68+) em biópsias de pele de 48 pacientes com hanseníase, sendo 33 VV e 15 TT e descobriram que a carga bacteriana estava relacionada a intensidade da imunomarcacão para iNOS e Slc11a1, mas não para a CD68. Eles sugerem que o bacilo pode aumentar a expressão de Slc11a1 e iNOS em macrófagos na hanseníase VV, contudo Slc11a1 também pode regular a expressão de iNOS. Essa expressão de Slc11a1 e iNOS regulada positivamente pode não ser capaz de eliminar o patógeno na hanseníase VV (PEREIRA-SUÁREZ et al, 2015).

2.9 Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF)

Os vasos sanguíneos têm uma participação estratégica na resposta imune inflamatória, com importante expressão de citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e fatores hemostáticos por células endoteliais que podem ser identificados precocemente e auxiliar clinicamente como biomarcadores de algumas doenças infecciosas (NOGUEIRA, LATINI, NOGUEIRA, 2016). O VEGF é um dos mais importantes agentes angiogênicos relacionado ao aumento da permeabilidade vascular e neovascularização em câncer, retinopatia diabética, feridas, degeneração macular relacionada à idade e infecções parasitárias (NIZET, JOHNSON, 2009).

O VEGF se liga ao seu receptor presente em células endoteliais para que se inicie a angiogênese, esses receptores são chamados de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3. A ativação do VEGF pode ocorrer por inúmeros estímulos, entre eles a hipóxia e a isquemia, e algumas citocinas. Em situações de hipóxia, ocorre uma vasodilatação periférica devido ao aumento do NO circulante e uma estabilização do HIF-1 α , e por conseguinte um aumento nos níveis de VEGF (NOCITI et al, 2015).

A angiogênese aumenta o VEGF na inflamação granulomatosa, promovendo a migração e ativação de macrófagos para a região (NOGUEIRA, LATINI, NOGUEIRA, 2016). A ativação endotelial induz ao estímulo de moléculas que podem implicar na patogênese das reações hansênicas (NOGUEIRA, LATINI, NOGUEIRA, 2016). Há muitos fatores angiogênicos e angiostáticos que podem estimular a expressão de VEGF para aumentar a permeabilidade vascular, entre eles o HIF-1 α , que se liga ao

promotor VEGF para iniciar e ativar a transcrição do gene, além disso o HIF-1 α também está relacionado com o estímulo de angiogênese em situações de isquemia tecidual (NIZET, JOHNSON, 2009; KONNER, DUPONT, 2004; MAJMANDAR, WONG, SIMON, 2010).

Fiallo et al, (2002) mostraram uma elevada expressão de VEGF e KDR (receptor do VEGF nas células endoteliais) em amostras de RR quando comparadas aos casos de hanseníase não-reacional e evidenciaram uma expressão aumentada de VEGF nas células dendríticas e que estas células poderiam representar sítios de armazenamento do fator e a liberação do mesmo poderia ser significativa para a transmissão do sinal no início da RR (FIALLO, CLAPASSON, FAVRE, PESCE, 2002). Os resultados obtidos por Khadge et al, (2015), também mostraram um aumento do VEGF no início da RR, além de outros marcadores como IP-10 e IL-1 β (KHADGE et al, 2015). Em contrapartida, Nogueira et al, (2016), revelou que houve maior expressão de VEGF e fator tecidual em amostras de endotélio da hanseníase não-reacional quando comparada a controles saudáveis (NOGUEIRA, LATINI, NOGUEIRA, 2016).

Soares et al, (2013) avaliaram em seu estudo a angiogênese e a linfangiogênese nas formas da hanseníase, nos episódios reacionais da doença e em suas lesões residuais através de imunohistoquímica e observaram que a angiogênese está presente em todas as formas da hanseníase, inclusive nos estágios reacionais (SOARES et al, 2013).

O aumento do VEGF foi observado na tuberculose pulmonar, uma doença granulomatosa, onde os autores verificaram maiores níveis séricos de VEGF na tuberculose pulmonar ativa em relação a tuberculose antiga e bronquite aguda (MATSUYAMA et al, 2000).

Outra doença granulomatosa onde pode-se observar o aumento dos níveis de VEGF foi a doença pulmonar causada por *Mycobacterium avium*, favorecendo o desenvolvimento de inflamação crônica. Este estudo sugeriu que os níveis de VEGF estão relacionados a extensão das lesões granulomatosas, em particular nas pequenas lesões nodulares que são características da infecção pelo *M. avium*, sendo as principais fontes de VEGF os macrófagos alveolares, células epitelióides, células gigantes multinucleadas, linfócitos, e células epiteliais das vias aéreas (NISHIGAKI et al, 2006).

3 JUSTIFICATIVA

Os biomarcadores são indicadores que sinalizam um processo normal ou uma condição patológica, e podem ser diferentes tipos de moléculas: DNA, RNA, proteínas, lipídios, metabólitos ou mediadores encontrados em sangue, fluidos corporais ou tecidos. Seu principal uso tem como a finalidade diagnosticar doenças, prever resultados clínicos, e monitorar as respostas terapêuticas e a imunidade (ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2011).

Atualmente vários biomarcadores tem sido avaliados com potencial valor diagnóstico, especialmente em doenças infecciosas (FRAGA et al, 2012; PAGE, LILES, 2013) e câncer (KOZAKIEWICZ, SOBOL, PATERA, 2016). Já existem evidências que algumas moléculas podem estar expressas de maneira alterada na presença de parasitoses, como o HIF-1 α , presente em lesões cutâneas leishmanióticas (ROCHA et al, 2018) e no câncer de pele (MICHAYLIRA, NAKAGAWA, 2006).

Nas infecções micobacterianas há formação de granulomas que atua contendo a infecção e evitando que o microrganismo se dissemine e os macrófagos são encontrados abundantemente nessa condição (CARDOSO et al, 2015). O HIF-1 α está presente em situações de hipóxia e em processo de inflamação e regula diversas moléculas, como por exemplo o NO e TNF e sua ativação é importante para os mecanismos de defesa do hospedeiro, controlando a infecção (ZINKERNAGEL, JOHNSON, NIZET, 2007; SINGH et al, 2012; CARDOSO et al, 2015). Além disso, autores mostraram que o HIF-1 α tem uma correlação positiva com o iNOS, amplificando a ativação dos macrófagos no local da infecção (BRAVERMAN, STANLEY, 2017).

O VEGF é um fator para angiogênese e encontra-se expresso em altas concentrações em melanomas, sendo relacionado a um mal prognóstico (DAUD et al, 2017); também pode encontrar-se elevado em material biológico de indivíduos com malária (FURUTA, KIMURA, WATANABE, 2010). Estudos *in vitro* realizado em biópsias de pele de pacientes com hanseníase, sugerem que o VEGF esta presente nas fases iniciais da RR, levando a um processo inflamatório em pele e nervos periféricos acometidos pelo *Mycobacterium leprae* (Fiallo et al, 2002; ANDRADE, BARRAL-NETTO, 2011; ANDRADE, NERY, 2014).

Estratégias terapêuticas no futuro envolvendo a regulação destes biomarcadores relacionado a exacerbação de quadros inflamatórios poderá ser utilizado na hanseníase que além de patologia infecciosa, é também doença relacionada ao sistema imunológico, cujo desfecho, favorável ou não, independentemente do tratamento medicamentoso específico e eficaz, é relacionado diretamente à modulação desta resposta.

A ativação do endotélio é um fator de grande importância a ser estudado nas reações de hanseníase, devido à grande quantidade de moléculas produzidas que influenciam na patogênese da doença. Estudos em material de lesões humanas poderiam ajudar a obter maior esclarecimento da patogênese, bem como buscar alternativas para fins de diagnóstico, prognóstico e de tratamento da hanseníase. Diante disso, há uma necessidade de se investigar mais detalhadamente se existe uma participação do VEGF, HIF-1 α e iNOS no controle das lesões hansênicas, devendo levar em consideração que não há como prever ou detectar precocemente o risco de desenvolvimento de episódios reacionais de hanseníase através de exames laboratoriais (Mizoguti et al, 2015), esses estudo vem a colaborar com a necessidade de otimização do prognóstico das diferentes formas clínicas de hanseníase. A busca e identificação de biomarcadores poderá ser útil para o monitoramento do curso clínico (STEFANI et al, 2009; KHADGE et al, 2015; NOGUEIRA, LATINI, NOGUEIRA, 2016).

4 PERGUNTA CONDUTORA

Existe diferença na expressão de HIF-1 α , VEGF e iNOS nas diferentes formas clínicas da hanseníase?

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Determinar *in situ* os marcadores HIF-1 α , VEGF e iNOS em espécimes cutâneas de pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar se existe diferença na expressão *in situ* dos biomarcadores: HIF-1 α , VEGF entre as formas tuberculóide e virchowiana da hanseníase;
- Avaliar a expressão de iNOS nas diferentes formas clínicas da hanseníase;

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 População e local de estudo

Foram analisadas 23 amostras de biópsias cutâneas de pacientes com hanseníase tuberculóide (15 amostras), vichorwiana (4 amostras), indeterminada (3 amostras), reação tipo 2 (1 amostras). Os pacientes foram selecionados a partir de análise detalhada dos prontuários e fichas de acompanhamento médico, a confirmação de hanseníase se deu através dessa análise detalhada. Foram analisados os perfis clínicos e laboratoriais desses pacientes que foram atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco com biopsias realizadas entre o período de 2014 a 2018.

Para inclusão no projeto, os critérios exigidos foram espécimes cutâneas de hanseníase classificados como virchowianos, tuberculóides, e indeterminado, virgens de tratamento e espécimes cutâneas de fases reacionais da hanseníase em tratamento. E como critério de exclusão, foram espécimes cutâneas de hanseníase que apresentaram no momento do diagnóstico quaisquer co-infecções ou outras doenças de natureza autoimune.

Esse estudo foi realizado seguindo os protocolos éticos de pesquisa em seres humanos com aprovação do comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) sob registro (CAAE 88560218.8.0000.5208).

6.2 Imunohistoquímica

Para detecção imunohistoquímica (IHQ) de antígenos nos tecidos, foi feita a IHQ indireta que abrange um anticorpo primário não-conjugado e um anticorpo secundário .

Quanto aos anticorpos primários, para detecção de HIF-1 α , foi usado o *HIF-1 alpha polyclonal antibody* (Product Datasheet, Novus Biologicals a Bio-techné®, USA), para detecção de VEGF, foi usado o *anti-VEGF rabbit polyclonal antibody* (Proteintech®, USA), para detecção do iNOS, foi usado o *Anti-iNOS Rabbit monoclonal antibody* (Sigma-Aldrick®, Darmstadt, Alemanha).

Quanto a peroxidase, foi utilizada a *anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody* (©Amersham Biosciences, *United Kingdom*).

O anticorpo secundário empregado foi o *kit* Histotain®-SP Broad Spectrum (HRP) Invitrogen™ (Novex by Life Technologies, *USA*).

Foi utilizado cromógeno 3,3'DAB e o substrato H₂O₂. Como controle normal utilizou-se pele humana normal e como controle positivo: lesão ativa de leishmaniose cutânea humana (referência).

As lesões foram classificadas de acordo com Ridley e Jopling representada pelas formas tuberculoide-tuberculoide (TT), virchowiana-virchowiana (VV) e indeterminada (I). Além dessas formas clínicas, foi incluída 1 amostra de reação hansênica tipo 2.

A análise foi feita de forma qualitativa, sendo o resultado expresso como positivo ou negativo para os marcadores estudados. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, utilizando-se a objetiva de 40x.

Foram feitos cortes de 5 µm de espessura das amostras parafinizadas e colocados em lâminas para posterior análise. As amostras de controle positivo e negativo seguiram o mesmo protocolo.

Os espécimes, após colocados em lâminas foram desparafinizados e hidratados da seguinte forma:

1. As lâminas foram submersas em xilol I e II durante 10 minutos cada;
2. Depois foram submersas em álcool etílico absoluto por 5 minutos;
3. Depois em álcool etílico a 95%, durante 5 minutos;
4. A seguir, em álcool etílico a 80%, durante 5 minutos
5. Depois em álcool etílico a 70%, durante 5 minutos
6. E por fim, submersos em água destilada, durante 5 minutos. Após esse processo as amostras seguiram para iniciar a realização da IHQ

As amostras foram colocadas em tampão citrato pH 6 e seguiram para o banho-maria a seco a 95°C por 45 minutos. Após esse tempo, as amostras foram lavadas três vezes em PBS Tween a 0,2%, durante 5 minutos cada lavagem.

Após a lavagem, foi adicionado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 5% em PBS Tween a 0,2%, cada espécime recebeu 100 µl da solução durante 45 minutos. Em seguidas essas amostras foram lavadas mais três vezes com PBS Tween.

Após isso, 100 µl de PBS BSA a 1% foi colocado sobre os espécimes durante 30 minutos, e após esse tempo foi feita a solução com o anticorpo primário (HIF-

1 α /VEGF/iNOS) em PBS BSA a 1%, e dessa solução, foram adicionados 100 μ l em nas amostras teste e nas amostras controle. Em seguidas essas amostras foram incubadas na geladeira a 8°C por 24 horas.

Passadas as 24 horas, as amostras foram lavadas mais três vezes com PBS Tween a 0,2%, e em seguida foi adicionado o anticorpo secundário, durante 45 minutos. Após esse tempo, lavou-se mais três vezes as amostras com PBS Tween a 0,2% e em seguida, foi adicionado a *Streptavidina* - HRP do kit Invitrogen®, durante 30 minutos. As amostras seguiram mais três vezes para lavagem com PBS Tween a 0,2%, e em seguida foi preparada uma solução com Tris HCL e o revelador DAB, durante até 5 minutos e nesse tempo as lâminas foram incubadas protegidas da luz.

Após esse procedimento, as lâminas de preparação para HIF-1 α e iNOS foram contracoradas com hematoxilina, e as lâminas de preparação para VEGF foram contracoradas com hematoxilina e eosina, e depois todas foram para o processo de desidratação e diafanização:

1. Primeiramente foram submersas em álcool etílico a 70%, durante 5 minutos;
2. A seguir, em álcool etílico a 80%, durante 5 minutos;
3. Depois em álcool etílico a 95%, durante 5 minutos;
4. Depois foram submersas em álcool etílico absoluto por 5 minutos;
5. E por fim, as lâminas foram submersas em xilol I e II durante 10 minutos cada;

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, utilizando-se a objetiva de 40x.

Toda metodologia foi realizada de acordo com as normas dos fabricantes. Os ensaios foram realizados no Departamento de Parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (Parasitologia/IAM-PE) e no Laboratório de Parasitologia/Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE).

6.3 Análise estatística

Inicialmente os dados foram descritos através de frequências absolutas e percentuais (variáveis qualitativas) e por meio de medidas como média, desvio-padrão, mínimo, mediana e máximo (variáveis quantitativas). As associações entre as variáveis qualitativas foram feitas através do teste exato de Fisher. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software SAS 9.2. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

7 RESULTADOS

7.1 Artigo que será submetido à Revista *International Journal of Experimental Pathology*:

Avaliação *in situ* dos marcadores VEGF, HIF-1 α e iNOS em biópsias de pele de pacientes com hanseníase.

RESUMO

A hanseníase é uma doença dermatológica, granulomatosa crônica, que acomete pele e nervos periféricos. Esse estudo buscou caracterizar *in situ* os marcadores HIF-1 α , VEGF e iNOS em espécimes cutâneas de hanseníase (vichorwiana, tuberculoide, indeterminada, e reacional tipo 2) para verificar se existe diferença entre as formas clínicas. Foram analisadas 23 biópsias cutâneas de pacientes com as diferentes formas clínicas da hanseníase em um hospital público federal de Recife, Pernambuco. A técnica de imuno-histoquímica foi utilizada para avaliação qualitativa da expressão das proteínas com os resultados expressos em positivos e negativos para os marcadores. Este trabalho traz um capítulo ainda não investigado envolvendo na infecção por hanseníase identificando marcadores imuno-histoquímicos em biópsias cutâneas de pacientes portadores de hanseníase nas suas diferentes formas clínicas com a finalidade de verificar se existe diferença entre as diferentes formas clínicas desta patologia. Verificamos positividade em todas as amostras com a forma tuberculóide (TT) para HIF-1 α , enquanto as amostras da forma virchowiana (VV) foram negativas ($p < 0,01$). O iNOS foi positivo em 80% das amostras TT e negativo nas amostras VV. Nas amostras avaliadas não encontramos diferenças na expressão do VEGF entre as formas TT e VV. Os achados sugerem que o HIF-1 α e o iNOS podem estar envolvidos na proteção contra a forma vichorwiana da hanseníase.

Palavras-chave: Angiogênese. Hanseníase. Hipóxia. Pele.

1 INTRODUÇÃO

A hanseníase é causada pelo *Mycobacterium leprae* um bacilo intracelular obrigatório, álcool ácido resistente, com multiplicação lenta. É uma doença dermatológica, granulomatosa crônica, neurológica, imunológica e sistêmica, que apresenta várias manifestações clínicas acometendo pele e nervos periféricos^{8,9,10}. Sua transmissão ocorre, principalmente, através do trato respiratório superior ou pelo contato com a pele lesionada⁵.

A hanseníase é principalmente reportada nos países onde as condições socioeconômicas e ambientais são precárias, sendo a Índia o país com maior taxa de detecção de novos casos e o Brasil ocupando a segunda posição no *ranking* mundial na detecção de novos casos, e as regiões mais acometidas são a Norte, Nordeste e Centro-Oeste^{1,2}. Segundo a Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) o Brasil é o único país das Américas que não conseguiu eliminar a hanseníase como problema de saúde pública, com a taxa de 94% de novos casos³.

O Brasil segue as recomendações da Estratégia Global para Hanseníase 2016-2020 da Organização Mundial de Saúde (OMS), cujo objetivo é reduzir a carga da doença de forma global e local⁴. A OMS estabelece uma meta de menos de 1,0 caso/10.000 habitantes para a eliminação da doença nos países⁵.

O Brasil apresentou em 2018, uma taxa de prevalência de 1,48 casos por 10.000 habitantes: sendo 2,15 no Nordeste (2,50 em Pernambuco)⁶. No Brasil, houve uma redução na taxa de detecção de novos no período entre 2001 e 2017 passando de 26,22/100 mil habitantes em 2001 para 13,74/100 mil habitantes em 2017².

O fator induzido por hipóxia 1-*alpha* (HIF-1 α) está presente em situações de hipóxia nos tecidos, sua ativação é importante para a capacidade bactericida dos fagócitos, além disso, regula a produção de diversas enzimas, entre elas a iNOS, que pode ter ação protetora ou nociva para o organismo^{11,12,13,14}. Um estudo identificou a presença de HIF-1 α nas fases iniciais da infecção pelo *Micobacterium marinum* em um modelo zebrafish e perceberam uma diminuição significativa da carga bacteriana no início da infecção pelo HIF-1 α via iNOS¹⁵. Na leishmaniose cutânea, o HIF-1 α apresentou-se como um fator protetor, enquanto na leishmaniose visceral o HIF-1 α contribui para determinar a resposta imunossupressora e a cronicidade da infecção¹⁶. Em outro estudo, o HIF-1 α foi associado ao controle da infecção por *Mycobacterium*

tuberculosis em camundongos via indução de IFN γ ¹⁷. Ainda não foi estudado o papel HIF-1 α em lesões cutâneas nas diferentes formas clínicas da hanseníase.

Na hanseníase, os macrófagos secretam várias substâncias tóxicas como forma de defesa do organismo, entre elas o iNOS (QUARESMA et al, 2010). A ativação do HIF, bem como o fator de necrose tumoral *alpha* (TNF- α), e interferon *gamma* (IFN- γ) aumentam a produção de iNOS regulando a resposta a inflamação^{18,19}.

Um estudo mostrou imunomarcagem de iNOS fortemente positiva em macrófagos nos granulomas. Também demonstraram a presença do iNOS em biópsias de pele de pacientes RR¹⁸. Outro estudo detectou maior produção de iNOS em pacientes com hanseníase borderline tuberculóide (BT) quando comparados a pacientes com hanseníase vichorwiana (VV), achado este que pode estar relacionado a capacidade do iNOS ser um agente bactericida ou bacteriostático²⁰.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) participa da angiogênese promovendo aumento da permeabilidade vascular e migração e ativação de macrófagos para sítio infeccioso^{21,22}. Fiallo et. al. 2002, verificaram um aumento da expressão de VEGF em células endoteliais e dendríticas em biópsias de pele de pacientes com reação hansênica tipo 1 em comparação com casos de hanseníase não-reacional, sugerindo que essas células poderiam representar sítios de armazenamento do VEGF e sua liberação implica na transmissão do sinal no início da RR²³.

Até o momento, o papel do HIF-1 α em lesões cutâneas de hanseníase não está esclarecido e este estudo revela um capítulo inédito envolvendo as diversas formas clínicas da hanseníase e o HIF-1 α , bem como corrobora com estudos anteriores sobre o iNOS e o VEGF nesta patologia.

Estudos com o VEGF, HIF-1 α e iNOS em material de lesões humanas podem ajudar no monitoramento do curso clínico dos pacientes com hanseníase. Este estudo avaliou *in situ* a expressão do HIF1 α , VEGF e iNOS em lesões de hanseníase (vichorwiana, tuberculóide, indeterminada e reacional tipo 2).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 População e local do estudo

Foram analisadas 23 amostras de biópsias de pele de pacientes com hanseníase, sendo 15 amostras da forma tuberculóide, 4 amostras da forma vichorwiana, 3 amostras da forma indeterminada e 1 amostra da forma reacional tipo 2. A seleção dos pacientes e a confirmação de hanseníase foi feita pela avaliação clínica através de fichas e prontuários dos pacientes. Foram analisados os perfis clínicos e laboratoriais de todos os pacientes que foram atendidos no Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco e tiveram a biópsia realizada entre o período de 2014 a 2018.

Esse estudo foi realizado seguindo os protocolos éticos de pesquisa em seres humanos com aprovação do comitê de ética do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) sob registro (CAAE 88560218.8.0000.5208).

2.2 Imunohistoquímica

Para detecção de antígenos nos tecidos, foi feita a imunohistoquímica (IHQ) indireta que abrange um anticorpo primário não-conjugado e um anticorpo secundário²⁴.

Os anticorpos primários empregados para detecção de HIF-1 α , VEGF e iNOS nos tecidos foram respectivamente: *HIF-1 alpha polyclonal antibody* (Product Datasheet, Novus Biologicals a Bio-technie®, USA), *anti-VEGF rabbit polyclonal antibody* (Proteintech®, USA), *Anti-iNOS Rabbit monoclonal antibody* (Sigma-Aldrick®, Darmstadt, Alemanha). Foi utilizada peroxidase *anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody* (©Amersham Biosciences, United Kingdom). O anticorpo secundário empregado foi o *kit Histotain®-SP Broad Spectrum (HRP)* Invitrogen™ (Novex by Life Technologies, USA). Foi utilizado cromógeno 3,3'DAB e o substrato peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Como controle normal utilizou-se pele humana normal e como controle positivo: lesão ativa de leishmaniose cutânea humana⁵⁰.

As lesões foram classificadas de acordo com Ridley e Jopling representada pelas formas tuberculoide-tuberculoide (TT), virchowiana-virchowiana (VV) e indeterminada (I). Além dessas formas clínicas, foi incluída 1 amostra de reação hansênica tipo 2.

A análise foi feita de forma qualitativa, sendo o resultado expresso como positivo ou negativo para os marcadores estudados. As lâminas foram analisadas em microscópio óptico, utilizando-se a objetiva de 40x.

Toda metodologia foi realizada de acordo com as normas dos fabricantes. Os ensaios foram realizados no laboratório de parasitologia do Instituto Aggeu Magalhães (Parasitologia/IAM-PE) e no Departamento de Medicina Tropical/Parasitologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE).

2.3 Análise estatística

Os dados foram descritos através de frequências absolutas e percentuais (variáveis qualitativas) e por meio de medidas como média, desvio-padrão, mínimo, mediana e máximo (variáveis quantitativas). As associações entre as variáveis qualitativas foram feitas através do teste exato de Fisher. Todas as análises foram feitas com o auxílio do software SAS 9.2. Para todas as análises adotou-se um nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

Foram analisadas 23 amostras de biópsias de pele de pacientes com hanseníase, sendo 15 (65,22%) amostras da forma tuberculóide, 4 (17,4%) amostras da forma vichorwiana, 3 (13,0%) amostras da forma indeterminada e 1 (4,3%) amostra da forma reacional tipo 2. Das 23 amostras, foram realizados testes de imuno-histoquímica para HIF-1 α em 17 amostras (73,9%), para VEGF em 15 amostras (65,2%) e para iNOS 15 amostras com resultados (65,2%). Quanto ao sexo, 12 (52,17%) eram do sexo feminino e 11 do sexo masculino (47,83%).

Foi possível identificar nos prontuários e fichas dos paciente, apenas a idade de 20 dos 23 pacientes (86,95%), com idade mínima de 14 anos e a máxima de 82 anos (tabela 1). O total de casos e as porcentagens das variáveis diagnóstico histopatológico, forma clínica, HIF-1 α , VEGF e iNOS estão descritos na tabela 2.

Tabela 1 – Caracterização dos pacientes quanto à idade.

	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Número de pacientes	55,3	17,3	14,0	58,0	82,0
20					

Tabela 2 – Total de casos e porcentagem das variáveis analisadas.

Variável	Total de casos	%
Forma clínica		
I	3	13,04
Reação T 2	1	4,35
TT	15	65,22
VV	4	17,39
HIF-1 <i>alpha</i>		
Negativo	4	23,53
Positivo	13	76,47
VEGF		
Positivo	15	100,00
iNOS		
Negativo	7	46,67
Positivo	8	53,33

Legenda: Forma clínica: I= Indeterminada; Reação T 2= Reação hansênica tipo 2; VV= Vichorwiana; TT= Tuberculóide.

Verificamos que todas as amostras com a forma clínica TT foram positivas para HIF-1 α , enquanto as amostras VV foram negativas ($p < 0,01$), o que nos sugere que o HIF-1 α pode estar envolvido na proteção contra a forma disseminada da hanseníase. O iNOS apresentou-se negativo nos casos de hanseníase VV, enquanto nas amostras TT o resultado variou, porém houve positividade na maioria das amostras analisadas ($p = 0,04$). Não houve nenhuma diferença estatística significativa para VEGF, visto que houve positividade tanto na forma TT quanto na forma VV (tabela 3).

Não foram considerados estatisticamente os resultados da forma indeterminada e reacional tipo 2 na tabela 3, devido à pouca quantidade de amostras, porém 2 amostras indeterminadas foram positivas para HIF-1 α e VEGF e devido a falta de material suficiente não foram testadas para iNOS. Uma terceira amostra da forma indeterminada foi negativa para iNOS, porém não havia material suficiente para testar HIF-1 α e VEGF. A forma reacional tipo 2 foi negativa para iNOS, devido a falta de material suficiente não foi testada para HIF-1 α e VEGF.

Tabela 3 – Associações envolvendo a forma clínica

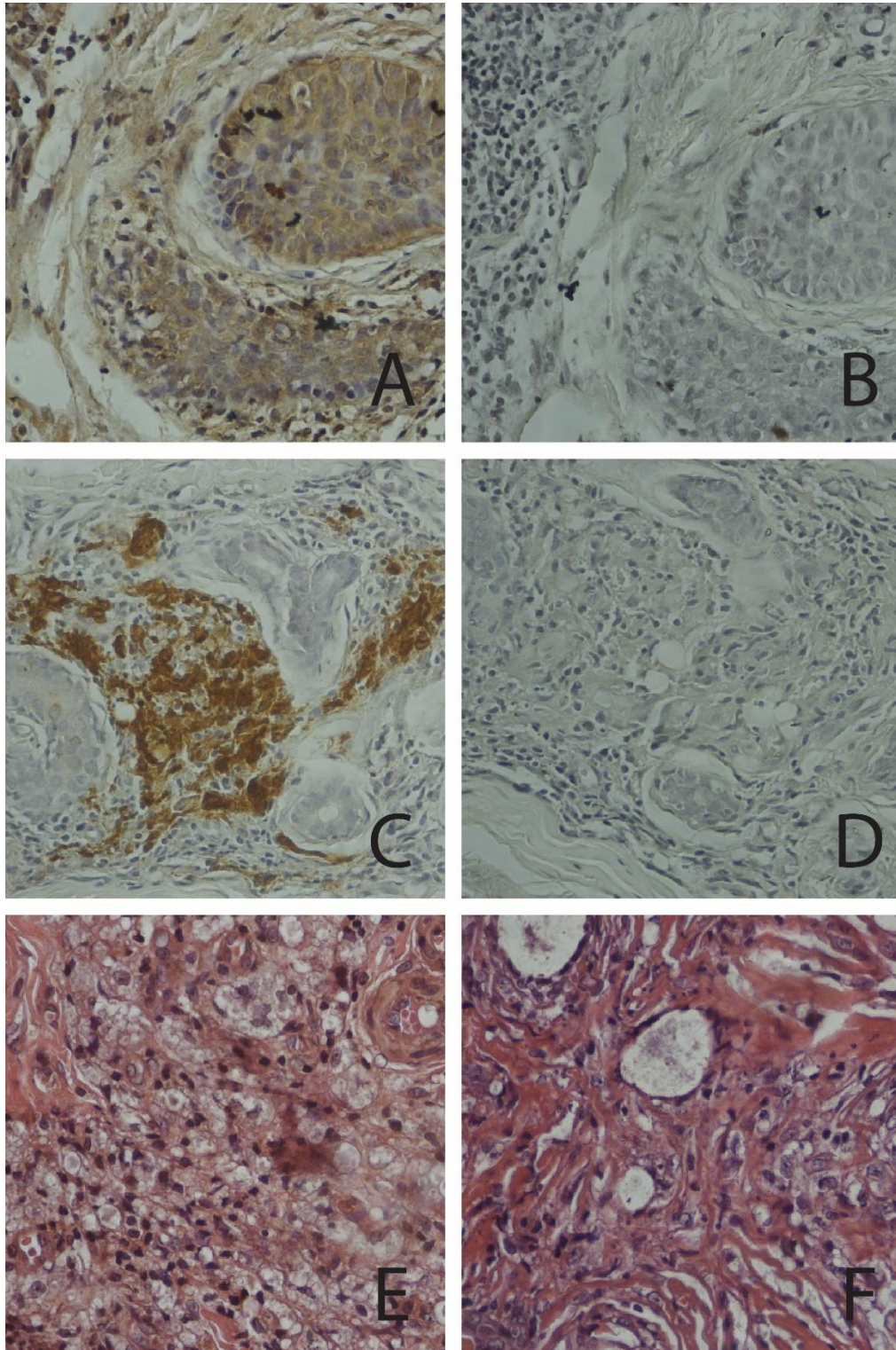
Variável	FORMA CLÍNICA			Valor-p
	TT*	VV**	Total	
HIF-1 <i>alpha</i>				
Negativo	0(0%)	4(100%)	4	<0,01
Positivo	11(100%)	0(0%)	11	
Total	11	4	15	
VEGF				
Positivo	11(100%)	2(100%)	13	0,04
Total	11	2	13	
iNOS				
Negativo	2(20%)	3(100%)	5	0,04
Positivo	8(80%)	0(0%)	8	
Total	10	3	13	

Legenda: Forma clínica: VV= Vichorwiana; TT= Tuberculóide.

* Na forma clínica TT, 4 amostras não foram testadas por falta de material para HIF-1 *alpha* e VEGF. Para iNOS, foram testadas apenas 10 amostras.

** Na forma clínica VV, apenas 2 amostras foram testadas para VEGF e 3 para iNOS, devido à falta de material suficiente nas demais amostras.

Figura 4 – Expressão de HIF-1 α em lesões cutâneas de hanseníase tuberculóide (A) e controle negativo sem expressão de HIF-1 α (B); Expressão de iNOS em lesão cutânea de hanseníase tuberculóide (C) e controle negativo sem expressão de iNOS (D); Expressão de VEGF em lesões cutâneas de hanseníase vichorwiana (E) e controle negativo sem expressão para VEGF (F). As secções A a D (x 40) foram coradas com imunoperoxidase e com hematoxilina. As secções E e F (x 40) foram coradas com imunoperoxidase e com hematoxilina e eosina.



Fonte: Próprio autor.

Os controles positivos para os marcadores HIF-1 α , VEGF e iNOS usados na técnica de imuno-histoquímica foram baseados em estudos científicos que usaram os mesmos marcadores e a mesma técnica em amostras de indivíduos com leishmaniose, uma doença inflamatória crônica que atinge a pele^{25,26,30,34}. Foram utilizadas amostras de pele de indivíduos saudáveis como controle normal para as reações.

4 DISCUSSÃO

Os biomarcadores são indicadores que sinalizam um processo normal ou patológico²⁸. A ativação do endotélio produz uma vasta quantidade de moléculas que influenciam na patogênese da hanseníase, sendo assim considerado um fator importante a ser estudado nesta patologia. Estudos em material de lesões humanas podem ajudar a obter maior esclarecimento da patogênese.

A ativação do HIF-1 α é essencial para a capacidade bactericida dos fagócitos, devido a produção de várias moléculas efetoras que participam dos mecanismos de defesa do indivíduo infectado^{12,13}, levando a indução e estimulação de moléculas como o iNOS e o VEGF^{19,21,31,32}.

A expressão do HIF-1 α é induzida por uma série de estresses celulares, como a ativação da via de estresse oxidativo sob infecção^{33,45}. O aumento do estresse oxidativo tem sido observado na hanseníase. A desregulação ou disfunção do HIF-1 α pode interromper essa transdução celular de sinalização nas respostas do hospedeiro à infecção pelo *M. Leprae*^{27,29}.

Não há relatos na literatura sobre a expressão de HIF-1 α em biópsias de lesões cutâneas de hanseníase, pouco se sabe sobre o papel do HIF-1 α nesta patologia e este estudo traz resultados inéditos sobre este marcador na hanseníase.

Estudos com o HIF-1 α na hanseníase são escassos, porém é possível encontrar estudos com o HIF-1 α e outros patógenos que apresentem resposta granulomatosa. Um estudo mostrou que na leishmaniose cutânea induzida por *Leishmania major* o HIF-1 α teve um papel protetor, enquanto na leishmaniose visceral o HIF-1 α mostrou ter um papel prejudicial contribuindo para a cronicidade da infecção em camundongos¹⁶. Outro estudo com *Leishmania donovani* demonstrou que o crescimento do parasito intracelular foi favorecido na presença de HIF-1 α , além disso

a infecção por *L. donovani* foi capaz de aumentar a transcrição de HIF-1 α e sua estabilização, sendo assim o HIF-1 α um fator de proteção para o parasito¹³.

O nosso estudo demonstrou o papel do HIF-1 α em espécimes cutâneas de hanseníase e apresentou-se fortemente positivo nas amostras de hanseníase tuberculóide (TT), e negativo nas amostras com a forma virchowiana (VV), esses achados podem sugerir que o HIF-1 α pode estar relacionado a proteção do indivíduo contra a forma virchowiana da hanseníase, visto que pacientes com a forma TT apresentam resistência ao bacilo^{35,36}.

Autores demonstraram uma correlação positiva entre iNOS e HIF-1 α , que amplifica a ativação de macrófagos, controlando assim, a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* via indução de IFN γ ¹⁷. Outros autores estudaram o *zebrafish* infectado com *Mycobacterium marinum* e a sinalização de HIF-1 α e verificaram que o HIF-1 α , quando estabilizado nas fases iniciais da infecção, pode diminuir a carga bacteriana no hospedeiro através da ação do iNOS¹⁵.

Nossos estudos mostraram a presença de iNOS em espécimes cutâneas de hanseníase TT, apenas duas amostras TT foram negativas para iNOS, enquanto as amostras de lesões virchowianas, reacional tipo 2 e indeterminada não apresentaram a presença do iNOS. Nossos achados sugerem que o iNOS pode estar relacionado a proteção contra a forma virchowiana desta patologia, igualmente o HIF-1 α , já que pacientes com a forma TT apresentam maior resistência ao bacilo^{35,36} e corroboram com estudos anteriores que mostraram a presença de iNOS em biópsias cutâneas de pacientes com reação hansênica tipo 1 (RR), de modo geral, pacientes TT que evoluem para quadro reacional, tendem a evoluir para a forma reacional tipo 1 ou reação reversa (RR)^{18,20,37}. Belone, (2004) também evidenciou a expressão de iNOS, por meio de imunohistoquímica, em biópsias cutanêas de indivíduos virgens de tratamento, em maior quantidade nos pacientes TT do que nos demais grupos por ele estudado (DT, TR e DTR)³⁸. Por outro lado, De Sousa et al, (2017), em seu estudo envolvendo 33 pacientes, sendo 17 da forma TT e 16 da forma VV, mostraram um aumento do iNOS na hanseníase virchowiana³⁹.

As moléculas de adesão tem um importante papel no direcionamento de leucócitos para os sítios inflamatórios. É sabido que o VEGF é um fator de angiogênese e encontra-se aumentado na inflamação granulomatosa²², e estudos em melanomas revelam que o VEGF é um fator de mal prognóstico e encontra-se expresso em altas concentrações⁴⁰. Seu aumento também foi observado em doenças

granulomatosas como na tuberculose pulmonar ativa em relação a tuberculose antiga e bronquite aguda⁴¹ e na doença pulmonar causada pelo *Mycobacterium avium*, que propiciou o desenvolvimento de inflamação crônica, além disso sugeriram que os níveis de VEGF estão relacionados a extensão das lesões granulomatosas⁴².

Verificamos em nossos estudos, a presença de VEGF, nas formas TT e VV das biópsias de pele de hanseníase, dados estes compatíveis com os achados de Soares et al, 2013 que observaram através de biópsias cutâneas de hanseníase que a angiogênese está presente em todas as formas da hanseníase, inclusive nos estágios reacionais⁴³. Os achados de Soares et al, 2013, também são compatíveis com os achados de Fiallo et al, 2002, Khadge et al, 2015 e Nogueira, Latini, Nogueira, 2016, onde os dois primeiros estudos mostraram um aumento da presença de VEGF na reação hansênica tipo 1 (RR), enquanto o terceiro estudo mostrou um aumento de VEGF nas formas não reacionais da hanseníase^{23,44,22}. Estes achados sugerem que há um aumento da permeabilidade vascular nas formas clínicas da hanseníase, no entanto não identificamos diferenças entre as formas clínicas.

Como perspectiva sugere-se estudos mais detalhados sobre o HIF-1 α , VEGF, e iNOS em lesões de hanseníase não-reacional e sua relação com o surgimento de formas reacionais da hanseníase, bem como deve ser mais explorado o papel do HIF-1 α nas diferentes formas clínicas da hanseníase, a fim de contribuir com o prognóstico dessa patologia.

5 CONCLUSÃO

Os achados mostraram que o HIF-1 α foi expresso em todas as amostras de hanseníase tuberculóide, enquanto não houve positividade na hanseníase virchowiana, bem como o iNOS que foi expresso na maioria das amostras de hanseníase tuberculóide sugerindo que o HIF-1 α e iNOS podem estar relacionados a uma proteção contra a forma disseminada ou virchowiana da hanseníase. O VEGF, por sua vez, esteve expresso em todas as formas de hanseníase analisadas (virchowiana, tuberculóide).

AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos ao Profº Drº Luiz Gonzaga de Castro do Serviço de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco por ter disponibilizado o material para às análises.

DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

P.L.B.C. concebeu o trabalho e elaborou o artigo, coleta de dados e os experimentos. F.L.M., S.G. realizaram as análises e interpretação dos dados. F.J.S.R. realizou os experimentos e fez uma revisão crítica do artigo. V.M.A.C realizou uma revisão crítica do artigo e aprovou a versão definitiva a ser publicada.

ORCID

Pryscilla Layanna Bezerra de Carvalho <https://orcid.org/0000-0001-6291-3436>.

Referências

1. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. (2018). Situação epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016. Boletim Epidemiológico. 49:1-15.
2. Ministério da Saúde. (2019). Hanseníase: o que é, causas, sinais e sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Saúde de A a Z. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseníase>>. Acesso em: 13 de jul de 2019.
3. Organização Pan-Americana Da Saúde/Organização Mundial Da Saúde. (2017). OPAS/OMS apresenta estratégia global e projeto para livrar Brasil da hanseníase. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5531:opas-oms-apresenta-estrategia-global-e-projeto-para-livrar-brasil-da-hanseníase&Itemid=812>. Acesso em 06 de fev de 2018.
4. Organização Mundial Da Saúde. Estratégia global para hanseníase 2016–2020: Aceleração rumo a um mundo sem hanseníase. (2017). Nova Deli: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Sudeste Asiático. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254907/9789290225881-por.pdf;jsessionid=98ED9950FEFA867D9C3325DDD39D80BE?sequence=8>>. Acesso em 13 de jul de 2019.
5. Araújo MG. (2005). Hanseníase no Brasil. *Revi Soc Bras Med Trop*, 36(3):373–382. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000300010>.
6. SINAN/SVS-MS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Sinan Net 2019. Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/17/Registro-ativo-n--mero-e-percentual--Casos-novos-de-hansen--ase-n--mero--coeficiente-e-percentual--faixa-et--ria--classifica----o-operacional--sexo--grau-de-incapacidade--contatos-examinados--por-UF-regi--es-Br-2018.pdf>>. Acesso em 22/08/2019.
7. Portal Brasil, Novos casos de hanseníase registram redução de 34% na última década. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/01/novos-casos-de-hanseníase-registram-reducao-de-34-na-ultima-decada>>. Acesso em 08 de maio de 2017.
8. Sugita Y. (1995). Leprosy. *Clinics in Dermatology*, 13(3):235-243.
9. Mendonça, VA, Melo GEBA, Teixeira AL, Costa RD, Antunes CM, et al. (2008). Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol*, 83(4):343–350. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962008000400010>.
10. Vazqu  ez CMP, Netto RSM, Barbosa KBF, et al. (2014). Micronutrients influencing the immune response in leprosy. *Nutr Hospi*, 29(1):26-36. doi:10.3305/nh.2014.29.1.6988.
11. Cardoso MS, Silva TM, Resende M, Appelberg R, Borges M. (2015). Lack of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in macrophages

- accelerates the necrosis of *Mycobacterium avium*-induced granulomas. *Infect Immun* 83:3534–3544. doi:10.1128/IAI.00144-15.
12. Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. (2007). Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med*, 85: 1339. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0282-2>.
 13. Singh AK, Mukhopadhyay C, Biswas S, Singh VK, Mukhopadhyay CK. (2012). Intracellular Pathogen *Leishmania donovani* Activates Hypoxia Inducible Factor-1 by Dual Mechanism for Survival Advantage within Macrophage. *PLoS ONE*, 7(6): e38489. doi:10.1371/journal.pone.0038489.
 14. Gordan JD & Simon MC. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev*, 17(1): 71–77. doi: 10.1016/j.gde.2006.12.006.
 15. Elks PM, Brizee S, Van der Vaart M, Walmsley SR, Van Eeden FJ, et al. (2013), Hypoxia Inducible Factor Signaling Modulates Susceptibility to Mycobacterial Infection via a Nitric Oxide Dependent Mechanism. *PLoS Pathog*, 9(12): e1003789. doi:10.1371/journal.ppat.1003789.
 16. Hammami A, Abidin BM, Charpentier T, Fabie´ A, Duguay A-P, Heinonen KM, et al. (2017) HIF-1 α is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*, 13(9): e1006616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006616>.
 17. Braverman J. & Stantey SA. (2017). Nitric Oxide Modulates Macrophage Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection through Activation of HIF-1 α and Repression of NF-Kb. *J Immunol*, 2017 Sep 1; 199(5): 1805–1816. doi:10.4049/jimmunol.1700515.
 18. Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. (2001). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br J Dermatol*. 145(5):809-15. doi:1046/j.1365-2133.2001.04491.x.
 19. Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W. (2005). Review: Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1): A Novel Transcription Factor in Immune Reactions. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Jun;25(6):297-310. doi:10.1089/jir.2005.25.297.
 20. Lockwood DNJ, Suneetha L, Sagili KD, Chaduvula MV, Mohammed I, et al. (2011). Cytokine and Protein Markers of Leprosy Reactions in Skin and Nerves: Baseline Results for the North Indian INFIR Cohort. *PLoS Negl Trop Dis* 5(12): e1327. doi:10.1371/journal.pntd.0001327.
 21. Nizet V & Johnson RS. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9(9): 609–617. doi:10.1038/nri2607.
 22. Nogueira MRS, Latini ACP, Nogueira MES. (2016). The involvement of endothelial mediators in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 111(10): 635-641. doi: 10.1590/0074-02760160122.
 23. Fiallo P, Clapasson A, Favre A, Pesce C. (2002). Overexpression of vascular endothelial growth factor and its endothelial cell receptor KDR in type 1

- leprosy reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(2):180–185. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.180.
24. Ferro AB. (2014). *Imunohistoquímica*. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa. p. 1-147. ISBN: 978-989-20-5416-2.
 25. Rocha FJS, et al. (2018). Expression on hypoxia-inducible factor-1 α in human tegumentary leishmaniosis caused by *Leishmania braziliensis*. *Annals of Parasitology*. 64(1):73–76. doi: 10.17420/ap6401.136.
 26. Santiago RC. (2013). A relação arginase-óxido nítrico na infecção experimental por *Leishmania braziliensis*. 68f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Curso de Pós-Graduação em Patologia. Salvador, 2013.
 27. Dong SY, et al. (2016). The epigenetic regulation of HIF-1 α by SIRT1 in MPP(+) treated SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470:453–459. doi: 10.1016 / j.bbrc.2016.01.013
 28. Andrade BB, Barral-Netto M. (2011). Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(Suppl. I): 70-78. doi: 0.1590/S0074-02762011000900009.
 29. Rajagopalan S, Rane A, Chinta SJ, Andersen JK. (2016). Regulation of ATP13A2 via PHD2-HIF1 α signaling is critical for cellular iron homeostasis: Implications for Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 36:1086–1095. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3117-15.2016.
 30. Fraga CAC, Oliveira MVM, de Alves LR, et al. (2012). Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol.* 87(5), 709–713. doi:10.1590/s0365-05962012000500006.
 31. Konner J, Dupont J. (2004). Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer*. 4 Suppl 2:S81-5. doi: 10.3816/CCC.2004.s.013.
 32. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*. 40(2), 294–309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.
 33. Movafagh S, Crook S, Vo K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: New developments in an old debate. *J. Cell. Biochem.* 116:696–703. Doi: 10.1002/jcb.25074.
 34. Halpern I. (2012). Células dendríticas plamocitóides, dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos, macrófagos e expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase na resposta tecidual cutânea da leishmaniose tegumentar americana. 153f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Patologia. São Paulo, 2012.
 35. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 2004; 75:639–653. doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.042.

36. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle de Hanseníase. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
37. Talhari S. et al. Hanseníase. 4. ed. Manaus: Ed. Fundação Medicina Tropical, 2006.
38. Belone AFF. (2004). Hanseníase na faixa tuberculóide: estudo comparativo entre manifestações tórpidas e reacionais através de avaliações de antígenos micobacterianos e de parâmetros representativos de hipersensibilidade mediada por células, em biópsias cutâneas. p. 32-64. Manuscrito: Equipe Técnica de Patologia, Instituto Lauro de Souza Lima. CxP 3012. Bauru. SP. Brasil. 17034-971.
39. de Sousa JR, de Sousa RPM, de Souza Aarão TL, et al. (2017). Response of iNOS and its relationship with IL-22 and STAT3 in macrophage activity in the polar forms of leprosy. *Acta Trop.* 171:74-79. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.03.016.
40. Daud A, Kluger HM, Kurzrock r, et. al. (2017). Phase II randomised discontinuation trial of the MET / VEGF receptor inhibitor cabozantinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 116(4):432–440. doi: 10.1038/bjc.2016.419.
41. Matsuyama W, Hashiguchi T, Matsumuro K, et al. (2000). Increased Serum Level of Vascular Endothelial Growth Factor in Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 162(3):1120–1122. doi: 10.1164/ajrccm.162.3.9911010.
42. Nishigaki Y, Fujiuchi S, Fujita Y, et al. (2006). Increased serum level of vascular endothelial growth factor in Mycobacterium avium complex infection. *Respirology.* 11(4):407-13. doi: 10.1111/j.1440-1843.2006.00863.x.
43. Soares CT, Rosa PS, Trombone AP, et. al. (2013). Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Spectrum of Leprosy and Its Reactional Forms. *PLoS One.* 8(9):e74651. doi: 10.1371/journal.pone.0074651.
44. Khadge S, Banu S, Bobosha K, et. al. (2015). Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh , Brazil , Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis.* 15:477. doi: 10.1186/s12879-015-1128-0.
45. Deshmane SL, et al (2009). Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *J. Biol. Chem.* 284:11364–11373. doi: 10.1074/jbc.M809266200.
46. Quaresma, JAS, de Oliveira Lima, LW, Fuzii, HT, Libonati, RMF, Pagliari, C, & Duarte, MIS (2010). Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. *Microbial Pathogenesis,* 49(4), 135–140. doi:10.1016/j.micpath.2010.05.003.

8 CONCLUSÃO

- Os achados mostraram que o HIF-1 α foi expresso em todas as amostras de hanseníase tuberculóide, enquanto não houve positividade na hanseníase virchowiana sugerindo que o HIF-1 α pode estar relacionado a uma proteção contra a forma disseminada da hanseníase.
- O VEGF, por sua vez, esteve expresso em todas as formas de hanseníase analisadas (virchowiana, tuberculóide).
- O iNOS foi expresso na maioria das amostras de hanseníase tuberculóide, o que sugere que este marcador também pode ser considerado um fator de proteção nesta forma clínica da hanseníase.

REFERÊNCIAS

- AARÃO, T. L. S. et al. Relationship between growth factors and its implication in the pathogenesis of leprosy. *Microbial Pathogenesis*, 2014; 77:66-72.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAM, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABDALLAH, M. et al. Serum Th1/Th2 and macrophage lineage cytokines in leprosy; correlation with circulating CD4(+) CD25(high) FoxP3(+) T-reg cells. *Experimental Dermatology*, 2014; 23(10):742-747.
- AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 2004; 75:639–653.
- ANDRADE A. R. C.; NERY J. A. C. Episódios reacionais da Hanseníase. p. 189-215, 2014.
- ANDRADE, B. B.; BARRAL-NETTO, M. Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2011; 106(Suppl. I): 70-78.
- ARAÚJO M. G. Hanseníase no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2005; 36(3):373–382.
- BEIGUELMAN, B.; QUAGLIATO, R. Sobre a reação de Mitsuda. *Rev. Bras. Leprol*. 1964; p. 39-46.
- BELONE, A. F. F. Hanseníase na faixa tuberculóide: estudo comparativo entre manifestações tórpidas e reacionais através de avaliações de antígenos micobacterianos e de parâmetros representativos de hipersensibilidade mediada por células, em biópsias cutâneas. 2004. p. 32-64. Manuscrito: Equipe Técnica de Patologia, Instituto Lauro de Souza Lima. CxP 3012. Bauru. SP. Brasil. 17034-971.
- BHANDARI, T.; NIZET, V. Hypoxia-Inducible Factor (HIF) as a Pharmacological Target for Prevention and Treatment of Infectious Diseases. *Infect Dis Ther*, 2014; 3:159–174.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle da hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010.
- BRAVERMAN, J.; STANTEY, S. A. Nitric Oxide Modulates Macrophage Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection through Activation of HIF-1 α and Repression of NF-Kb. *J Immunol*, 2017; 199(5): 1805–1816.
- BRIGHTBILL, H. D. et al. Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*, 1999; 285(5428):732-736.
- CARDOSO, M. S. et al. Lack of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in macrophages accelerates the necrosis of *Mycobacterium avium*-induced granulomas. *Infect Immun*, 2015; 83:3534 –3544.

- CRUVINEL, W. M. et al. Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. *Bras J Rheumatol*, 2010;50(4):434-61.
- CUEVAS J. et al. Erythema nodosum leprosum: reactional leprosy. *Semin Cutan Medi Surg*. 2007; 26(2):126-130.
- DAUD A. et al. Phase II randomised discontinuation trial of the MET / VEGF receptor inhibitor cabozantinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer*, 2017; 116(4):432–440.
- DE SOUSA, J. R. et al. Response of iNOS and its relationship with IL-22 and STAT3 in macrophage activity in the polar forms of leprosy. *Acta Trop*. 2017; 171:74-79.
- DEMANGEL, C.; BRITTON, W. J. Interaction of dendritic cells with mycobacteria: where the action starts. *Immunol Cell Biol*. 2000; 78(4):318-24.
- DESHMANE, S.L, et al. Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1 α expression. *J. Biol. Chem*. 2009;284:11364–11373.
- DONG, S. Y., et al. The epigenetic regulation of HIF-1 α by SIRT1 in MPP(+) treated SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2016;470:453–459.
- ELKS, P. M. et al. Hypoxia Inducible Factor Signaling Modulates Susceptibility to Mycobacterial Infection via a Nitric Oxide Dependent Mechanism. *PLoS Pathog*, 2013; 9(12): e1003789.
- FIALLO, P.; CLAPASSON, A.; FAVRE, A.; PESCE, C. Overexpression of vascular endothelial growth factor and its endothelial cell receptor KDR in type 1 leprosy reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2002; 66(2):180–185.
- FRAGA, C. A. C. et al. Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol*. 2012; 87(5), 709–713.
- FURUTA, T.; KIMURA, M.; WATANABE, N. Short Report : Elevated Levels of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Soluble Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR) -2 in Human Malaria. *Am J Trop Med Hyg*, 2010; 82(1):136-9.
- GETZ, B. Leprosy research in Norway, 1850–1900. *Med Hist*. 1958; 2(1): 65-7
- GORDAN, J. D.; SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev*, 2007; 17(1): 71–77.
- HALPERN, I. Células dendríticas plamocitóides, dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos, macrófagos e expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase na resposta tecidual cutânea da leishmaniose tegumentar americana. 2012. 153f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Patologia. São Paulo, 2012.
- HELLWIG-BÜRCEL, T. et al. (2005). Review: Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1): A Novel Transcription Factor in Immune Reactions. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Jun;25(6):297-310.
- KHADGE, S. et al. Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh , Brazil , Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis*. 2015; 15:477.

- KHANOLKAR-YOUNG, S.; SNOWDON, D.; LOCKWOOD, D. N. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol.* 1998; 113(3):438-42.
- KONNER, J.; DUPONT, J. Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer.* 2004; 4 Suppl 2:S81-5.
- KOYASU, S. et al. Regulatory mechanisms of hypoxia-inducible factor 1 activity: Two decades of knowledge. *Cancer Sci.* 2018; 109(3):560-571.
- KOZAKIEWICZ, A. B.; SOBOL, M.; PATERA, J. Expression of Hypoxia-Inducible Factor 1 α in Invasive Breast Câncer with Metastasis to Lymph Nodes: Correlation with Steroid Receptors, HER2 and EPO-R. *Adv Clin Exp Med.* 2016; 25(4):741-50.
- KRUTZIK, S. R. et al. Activation and regulation of Toll-like receptors 2 and 1 in human leprosy. *Nature Medicine,* 2003; 9(5), 525–532.
- KRUTZIK, S. R. et al. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nature Medicine,* 2005; 11(6), 653–660.
- KRUTZIK, S. R.; MODLIN R. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Semin Immunol.* 2004; 16(1):35-41.
- LASTORIA, J. C.; ABREU, M. A. M. M. Leprosy: review of the epidemiological, clinical, and etiopathogenic aspects - Part 1. *An Bras Dermatol.* 2014; 89(2):205-18.
- LOCKWOOD, D. N. J. et al. Cytokine and Protein Markers of Leprosy Reactions in Skin and Nerves: Baseline Results for the North Indian INFIR Cohort. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(12): e1327.
- MADRID. Memória Association International De La Lepra. IN: Congresso Internacional de Leprologia 6. p.1344, 1953.
- MAJMUNDAR, A. J; WONG, W. J.; SIMON, M. C. Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell,* 2010; 40(2), 294–309.
- MANALO, D. J. et al. Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1 Dominador. *Blood.* 2005; 105(2):659-69.
- MASTRANGELO, G. et. al. How to prevent immunological reactions in leprosy patients and interrupt transmission of *Mycobacterium leprae* to healthy subjects: Two hypotheses. *Med Hypotheses.* 2008; 71(4):551-63.
- MATSUYAMA, W. et al. Increased Serum Level of Vascular Endothelial Growth Factor in Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med,* 2000; 162(3):1120–1122.
- MENDONÇA, V. A. et al. Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol,* 2008; 83(4):343–350.
- MESQUITA, J. D. et al. Immune System – Part II Basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol.* 2010; 50(5):552-80.

MICHAYLIRA, C. Z.; NAKAGAWA, H. Hypoxic microenvironment as a cradle for melanoma development and progression. *Cancer Biol Ther.* 2006; 5(5):476-9.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. (2019). Hanseníase: o que é, causas, sinais e sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Saúde de A a Z. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseníase>>. Acesso em: 13 de jul de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sala de Apoio à Gestão Estratégica (SAGE). 2019. Disponível em: <http://sage.saude.gov.br/#>. Acesso em: 13 de jul de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle de Hanseníase. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. (2018). Situação epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016. *Boletim Epidemiológico.* 49:1-15.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância em saúde. Caracterização da situação epidemiológica da hanseníase e diferenças por sexo, Brasil, 2012-2016. *Boletim Epidemiológico.* v. 49, n.4, p. 1-12, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Procedimentos Técnicos Baciloscopia em Hanseníase. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

MIYAWAKI, T. Antígeno de Mitsuda para intradermoreação. Centro de Produção e Pesquisa de imunobiológicos. Paraná, 2008.

MODLIN, R. L.; HOFMAN, F. M.; TAYLOR, C. R.; REA, T. H. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patients with leprosy. *Am Acad of Dermatol.* 1983; 8(2):182-189.

MOSCHELLA, S. L. An update on the diagnosis and treatment of leprosy. *Am Acad of Dermatol.* 2004; 51(3):417-26.

MOUBASHER, A. D.; KAMEL, N. A.; ZEDAN, H.; RAHEEM, D. D. Cytokines in leprosy. I. Serum cytokine profile in leprosy. *Int J Dermatol.* 1998; 37(10):733-40.

MOVAFAGH, S., CROOK, S., VO, K. Regulation of hypoxia-inducible factor-1a by reactive oxygen species: New developments in an old debate. *J. Cell. Biochem.* 2015;116:696–703.

NERY, J. A.C. et. al. Contribuição ao diagnóstico e manejo dos estados reacionais: Uma abordagem prática. *An Bras Dermatol.* 2006; 81(4):367-75.

NETO, F. B. A. Regulação da interleucina 17, e células Th17 e interferon-γ em indivíduos portadores de hanseníase e sua associação com parâmetros clínicos. 2012. 103f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia. Recife, 2012

NISHIGAKI, Y. et al. Increased serum level of vascular endothelial growth factor in *Mycobacterium avium* complex infection. *Respirology.* 2006 Jul;11(4):407-13.

NIZET, V.; JOHNSON, R. S. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(9): 609–617.

- NOCITI, R. P. et al. O papel do fator de crescimento endotelial (VEGF) na formação e progressão de neoplasias mamárias de cadelas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, Belo Horizonte, 2015; 39(3):341-346.
- NOGUEIRA, M. E. S.; FLEURY, R. N.; ARRUDA, M. S. P. Eritema nodoso hansênico: análise comparativa do quadro histopatológico pelas técnicas de rotina e imunofluorescência. *Hansen. Int.*, 1995; 20(1):11-18.
- NOGUEIRA, M. R. S.; LATINI, A. C. P.; NOGUEIRA, M. E. S. The involvement of endothelial mediators in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2016; 111(10):635-641.
- OPROMOLLA, D. V. A. e cols. *Noções de Hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, 2000.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Estratégia global para hanseníase 2016–2020: Aceleração rumo a um mundo sem hanseníase. Nova Deli: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Sudeste Asiático. 2017. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254907/9789290225881-por.pdf;jsessionid=98ED9950FEFA867D9C3325DDD39D80BE?sequence=8>>. Acesso em 13 de jul de 2019.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE/ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. OPAS/OMS apresenta estratégia global e projeto para livrar Brasil da hanseníase. 2017. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5531:opas-oms-apresenta-estrategia-global-e-projeto-para-livrar-brasil-da-hanseniase&Itemid=812>. Acesso em 06 de fev de 2018.
- PAGE, A. V.; LILES, W. C. Biomarkers of endothelial activation / dysfunction in infectious diseases. *Virulence*, 2013; 4(6):507–516.
- PAIVA, A. P.; GIORGIO, S. Immunohistochemical evidence of stress and inflammatory markers in mouse models of cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol Res.* 2015; 307(8):671-82.
- PEREIRA-SUÁREZ, A. L. et al. Differential expression of solute carrier family 11a member 1 and inducible nitric oxide synthase 2 in skin biopsies from leprosy patients. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2015; 81(6):594-9.
- PORTAL BRASIL. Novos casos de hanseníase registram redução de 34% na última década. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/01/novos-casos-de-hanseniase-registram-reducao-de-34-na-ultima-decada>>. Acesso em 08 de maio de 2017.
- QUARESMA, J. A. et al. Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. *Microb Pathog.* 2010 Oct;49(4):135-40.
- RAJAGOPALAN, S., RANE, A., CHINTA, S. J., ANDERSEN, J. K. Regulation of ATP13A2 via PHD2-HIF1 α signaling is critical for cellular iron homeostasis: Implications for Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 2016;36:1086–1095.
- RIDLEY, D. S.; JOPLING, W. H. Classification of leprosy according to immunity- a five group system. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1966; 34(3):255-73.

RIDLEY, D. S.; RADIA, K. B. The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1981; 49(4):383-92.

ROCHA, F. J. S. et al. Expression on hypoxia-inducible factor-1 α in human tegumentary leishmaniosis caused by *Leishmania braziliensis*. *Annals of Parasitology.* 2018; 64(1):73–76.

RODRIGUES, L. C.; LOCKWOOD, D. N. J. Leprosy now: epidemiology, progress, challenges, and research gaps. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11(6):464-70.

SALGAME, P. et. al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 1991; 254(5029):279-82.

SANTIAGO RC. A relação arginase-óxido nítrico na infecção experimental por *Leishmania braziliensis*. 2013. 68f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Curso de Pós-Graduação em Patologia. Salvador, 2013.

SCHATZ, V.; NEUBERT, P.; RIEGER, F.; JANTSCH, J. Hypoxia, Hypoxia-Inducible Factor-1 α , and Innate Antileishmanial Immune Responses. *Front. Immunol.* 2018; 9:216.

SCHÖN, T. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br J Dermatol.* 2001; 145(5):809-15.

SECRETARIA DA SAÚDE. Governo do Estado do Ceará. Boletim Epidemiológico Hanseníase. p. 1-10. 21 de jan de 2019.

SECRETARIA DE POLÍTICAS DE SAÚDE. Portaria nº 3.125, de 7 de outubro de 2010.

SINAN/SVS-MS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Sinan Net 2017. Disponível em <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/julho/11/Tabela%20Geral_12016>. Acesso em: 06 de fev de 2018.

SINAN/SVS-MS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Sinan Net 2019. Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/17/Registro-ativo-n--mero-e-percentual--Casos-novos-de-hansen--ase-n--mero--coeficiente-e-percentual--faixa-et--ria--classifica----o-operacional--sexo--grau-de-incapacidade--contatos-examinados--por-UF-regi--es-Br-2018.pdf>>. Acesso em 22/08/2019.

SINGH, A. K. et al. Intracellular Pathogen *Leishmania donovani* Activates Hypoxia Inducible Factor-1 by Dual Mechanism for Survival Advantage within Macrophage. *PLoS ONE*, 2012; 7(6): e38489.

SOARES, C. T. et. al. Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Spectrum of Leprosy and Its Reactional Forms. *PLoS One.* 2013; 8(9):e74651.

SOUZA, A. R. Fenômeno de Sanarelli-Schwartzmann – a propósito da Lepra de Lúcio. *Rev Bras de Leprol.* n. 19, p. 161-165, 1951.

STEFANI, M. M. et al. Potential plasma markers of type I and type 2 leprosy reactions: a preliminary report. *BMC Infect Dis.* 2009; 9:75.

SUGITA Y. Leprosy. *Clinics in Dermatology*, 1995; 13(3):235-243.

TALHARI, S. et al. Hanseníase. 4. ed. Manaus: Ed. Fundação Medicina Tropical, 2006.

VAZQUÉZ, C. M.P. et al. Micronutrients influencing the immune response in leprosy. *Nutr Hosp*, 2014; 29(1):26-36.

VENTURINI, J. Hanseníase Dimorfa: perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares e *in situ*. Botucatu-SP, 2008. Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

WANG, D. et al. Missense Variants in HIF1A and LACC1 Contribute to Leprosy Risk in Han Chinese. *Am J Hum Genet*. 2018;102(5):794-805.

WEMAMBU, S. N. C.; TURK, J. L.; WATERS, M. F. R.; REES, R. J. W. Eryhema nodosum leprosum: clinical manifestation of the Arthus phenomenon. *Lancet*. 1969; 2(7627):933-5.

WEMAMBU, S. N.; TURK, J. L.; WATERS, M. F.; REES, R. J. Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. *PLoS One*. v. 5, n. 7:e11576, 2010.

WERTH, N. et al. Activation of hypoxia inducible factor 1 is a general phenomenon in infections with human pathogens. *PLoS One*. 2010;5(7):e11576.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chemotherapy of leprosy for control programmes. *Tech Rep Ser*, 1982; 675:1-33.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global leprosy update, 2014: need for EARLY CASE DETECTION.WHO, 2015; 90(36):461-476.

YAMAMURA, M. et al. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol*. 1992; 149(4):1470–5.

ZINKERNAGEL, A. S.; JOHNSON, R. S.; NIZET, V. Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med*, 2007; 85:1339.

APÊNDICE A – ARTIGO

In situ evaluation of VEGF, HIF-1 α and iNOS markers in skin biopsies of leprosy patients.

**Priscilla Layanna Bezerra de carvalho¹; Fábio Lopes de Melo²; Selma Giorgio³;
Francisca Janaína Soares Rocha¹; Vláudia Maria Assis Costa¹**

¹ Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Department of Parasitology, Aggeu Magalhães Research Center, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Department of Animal Biology, State University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil.

Corresponding Author: Priscilla Layanna Bezerra de Carvalho, Department of Tropical Medicine, Federal University of Pernambuco, Prof. Moraes Rego Av., 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil.

E-mail: prycarvalho90@gmail.com.

Funding information: This study was funded by a scholarship from the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

SUMMARY

Leprosy is a dermatological, chronic granulomatous disease that affects the skin and peripheral nerves. This study aimed to characterize in situ the markers HIF-1 α , VEGF and iNOS in skin specimens of leprosy (vichorwiana, tuberculoid, indeterminate, and type 2 reactional) to verify if there is difference between the clinical forms. We analyzed 23 cutaneous biopsies of patients with the different clinical forms of leprosy in a federal public hospital in Recife, Pernambuco. The immunohistochemistry technique was used for qualitative evaluation of the expression of proteins with the results expressed as positive and negative for the markers. This paper presents a chapter not yet investigated involving leprosy infection by identifying immunohistochemical markers in cutaneous biopsies of leprosy patients in their different clinical forms for the purpose of To verify if there is a difference between the different clinical forms of this pathology. We verified positivity in all samples with the tuberculoid form (TT) for HIF-1 α , while the virchowian (VV) samples were negative ($P = < 0.01$). The iNOS was positive in 80% of the TT and negative samples in the VV samples. In the evaluated samples we found no differences in VEGF expression between the TT and VV forms. The findings suggest that the HIF-1 α and iNOS may be involved in the protection against the Vichorwiana form of leprosy.

Keywords: Angiogenesis. Leprosy. Hypoxia. Skin.

1 INTRODUCTION

Leprosy is caused by *Mycobacterium leprae* a mandatory intracellular bacillus, resistant acid alcohol, with slow multiplication. It is a dermatological, chronic, neurological, immunological and systemic disease, which presents several clinical manifestations affecting the skin and perifetirous nerves^{8,9,10}. Its transmission occurs mainly through the upper respiratory tract or by contact with the skin lesionada⁵.

Leprosy is mainly reported in countries where socioeconomic and environmental conditions are precarious, with India being the country with the highest rate of detection of new cases and Brazil occupying the second position in the world hanking in the detection of new cases, and the Most affected regions are north, Northeast and Midwest^{1,2}. According to the Pan American Health Organization (PAHO), Brazil is the only country in the Americas that has failed to eliminate leprosy as a public health problem, with the rate of 94% of new cases³.

Brazil follows the recommendations of the Global strategy for leprosy 2016-2020 of the World Health Organization (WHO), whose objective is to reduce the burden of the disease in a global and local⁴. The WHO establishes a target of less than 1.0 case/10,000 inhabitants for the elimination of the disease in the countries⁵.

Brazil presented in 2018, a prevalence rate of 1.48 cases per 10,000 inhabitants: being 2.15 in the northeast (2.50 in Pernambuco)⁶. In Brazil, there was a reduction in the rate of detection of new in the period between 2001 and 2017, passing from 26,22/100 thousand inhabitants in 2001 to 13,74/100 thousand inhabitants in 2017².

The factor induced by hypoxia 1-alpha (HIF-1 α) is present in situations of hypoxia in the tissues, its activation is important for the bactericide capacity of phagocytes, moreover, regulates the production of several enzymes, including iNOS, which can have protective action or harmful to organismo^{11,12,13,14}. One study identified the presence of HIF-1 α in the early phases of *Micobacteruim marinum* infection in a zebrafish model and perceived a significant decrease in bacterial load at the onset of HIF-1 α infection via iNOS¹⁵. In cutaneous leishmaniasis, the HIF-1 α presented as a protective factor, while in visceral leishmaniasis, the HIF-1 α contributes to determine the immunosuppressive response and the chronicity of infection¹⁶. In another study, the HIF-1 α was associated with the control of *Mycobacterium tuberculosis* infection in

mice via induction of IFN- γ ¹⁷. The role of HIF-1 α in cutaneous lesions in the different clinical forms of leprosy has not been studied.

In leprosy, macrophages secrete several toxic substances as a form of defense of the organism, including iNOS⁴⁶. The activation of the HIF, as well as the tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and gamma interferon (IFN- γ) increase the production of iNOS regulating the response to inflammation^{18,19}.

One study showed strongly positive iNOS immunostaining in macrophages in the granulomas. They also demonstrated the presence of iNOS in skin biopsies of patients RR¹⁸. Another study detected higher production of iNOS in patients with borderline tuberculoid leprosy (BT) when compared to patients with vichorwian leprosy (VV), a finding that may be related to the ability of iNOS to be a bactericidal agent or Bacteriostatic²⁰.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) participates in angiogenesis promoting increased vascular permeability and migration and activation of macrophages to site Infecioso^{21,22}. Fiallo et. Al. 2002, verified an increase in the expression of VEGF in endothelial and dendritic cells in skin biopsies of patients with type 1 leprosy reaction in comparison with cases of non-reactional leprosy disease, suggesting that these cells could represent sites of storage of VEGF and its release implies the transmission of the signal at the beginning of the RR²³.

To date, the role of HIF-1 α in leprosy skin lesions is unclear and this study reveals an unprecedented chapter involving the various clinical forms of leprosy and the HIF-1 α , as well as corroborating previous studies on iNOS and VEGF in this Pathology.

Studies with VEGF, HIF-1 α and iNOS in material of human lesions may help to monitor the clinical course of leprosy patients. This study evaluated in situ the expression of HIF1 α , VEGF and iNOS in leprosy lesions (vichorwiana, tuberculoid, indeterminate and reactional type 2).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Population and place of study

We analyzed 23 samples of skin biopsies from leprosy patients, 15 samples of the tuberculous form, 4 samples of the vichorwiana form, 3 samples of the

indeterminate form and 1 sample of the reacinal form 2. Patient selection and leprosy confirmation were made by clinical evaluation through patient records and charts. The clinical and laboratory profiles of all patients who were attended at the dermatology service of the Hospital das Clínicas of the Universidade Federal de Pernambuco and had the biopsy performed between 2014 and 2018 were analyzed.

This study was conducted following the ethical protocols of research in humans with approval of the ethics of the Center for Health Sciences of the Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) under registration (CAAE 88560218.8.0000.5208).

2.2 Immunohistochemistry

For the detection of antigens in the tissues, an indirect immunohistochemistry (IHC) was performed that encompasses a non-conjugated primary antibody and a secondary antibody²⁴.

The primary antibodies used for detection of HIF-1 α , VEGF and iNOS in the tissues were respectively: HIF-1 alpha polyclonal antibody (Product Datasheet, Novus Biologicals a Bio-Techne®, USA), VEGF rabbit polyclonal antibody (Proteintech®, USA), Anti-iNOS Rabbit monoclonal antibody (Sigma-Aldrich®, Darmstadt, Germany). Peroxidase anti-rabbit IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody (© Amersham Biosciences, United Kingdom) was used. The secondary antibody used was the Histotain®-SP Broad Spectrum (HRP) Invitrogen™ (Novex by Life Technologies, USA) kit. Chromogen 3.3 ' DAB and hydrogen peroxide substrate (H₂O₂) were used.

As normal control, normal human skin was used and as positive control: active lesion of cutaneous leishmaniasis humana⁵⁰.

The lesions were classified according to Ridley and Jopling represented by the tuberculoid-tuberculoid (TT), Virchowiana-Virchowiana (VV) and indeterminate (I) forms. In addition to these clinical forms, 1 sample of type 2 leprosy reaction was included.

The analysis was performed qualitatively, and the result was expressed as positive or negative for the markers studied. The slides were analyzed in an optical microscope, using the 40x lens.

All methodology was carried out according to the manufacturers' standards. The tests were carried out at the Parasitology Laboratory of the Instituto Aggeu Magalhães (parasitology/IAM-PE) and in the Department of Tropical Medicine/parasitology of the Health Sciences Center of the Universidade Federal de Pernambuco (CCS-UFPE).

The study was conducted following all ethical research protocols in humans with approval of the Ethics Committee of the Center for Health Sciences of Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) under registration (CAAE 88560218.8.0000.5208).

2.3 Statistical analysis

Data were described through absolute and percentage frequencies (qualitative variables) and by means of measures such as mean, standard deviation, minimum, median and maximum (quantitative variables). The associations between the qualitative variables were made using Fisher's exact test. All analyses were performed with the aid of SAS 9.2 software. For all analyses, a significance level of 5% was adopted.

3 RESULTS

We analyzed 23 samples of skin biopsies from leprosy patients, 15 (65.22%) Samples of the Tuberculoid form, 4 (17.4%) Samples of the Vichorwian form, 3 (13.0%) Samples of the indeterminate form and 1 (4.3%) Sample of the Reacinal form type 2. Of the 23 samples, immunohistochemistry tests were performed for HIF-1 α in 17 samples (73.9%), for VEGF in 15 samples (65.2%) And for iNOS 15 samples with results (65.2%). As for sex, 12 (52.17%) were females and 11 males (47.83%).

It was possible to identify in the patient charts and records, only the age of 20 of the 23 patients (86.95%), with a minimum age of 14 years and a maximum of 82 years (table 1). The total number of cases and the percentages of the variables histopathological diagnosis, clinical form, HIF-1 α VEGF and iNOS are described in table 2.

Table 1 – Characterization of patients regarding age.

	Mean	Standard deviation	Minimum	Median	Maximum
Number of patients 20	55,3	17,3	14,0	58,0	82,0

Table 2 – Total Cases and percentage of the variables analyzed.

Variable	Total cases	%
Clinical form		
I	3	13,04
Reaction T 2	1	4,35
TT	15	65,22
VV	4	17,39
HIF-1 <i>alpha</i>		
Negative	4	23,53
Positive	13	76,47
VEGF		
Positive	15	100,00
iNOS		
Negative	7	46,67
Positive	8	53,33

Legend: Clinical form: I = indeterminate; Reaction T 2 = type 2 leprosy reaction; VV = Vichorwiana; TT = tuberculoid.

We verified that all samples with the TT clinical form were positive for HIF-1 α , while the VV samples were negative ($P = < 0.01$), suggesting that the HIF-1 α may be involved in the protection against the disseminated form of leprosy. The iNOS was negative in the cases of leprosy VV, while in the TT samples the result varied, but there was positivity in most of the samples analyzed ($P = 0.04$). There was no statistically significant difference for VEGF, since there was positivity in both TT and VV form (table 3).

The results of the indeterminate and reactional type 2 form in table 3 were not statistically considered due to the low amount of samples, but 2 undetermined samples were positive for HIF-1 α and VEGF and due to lack of sufficient material were not tested for iNOS. A third sample of the Inderteminated form was negative for iNOS, but

there was not enough material to test HIF-1 α and VEGF. The Type 2 reactive form was negative for iNOS, due to lack of sufficient material was not tested for HIF-1 α and VEGF.

The positive controls for the HIF-1 α , VEGF and iNOS markers used in the immunohistochemistry technique were based on scientific studies that used the same markers and the same technique in samples of individuals with leishmaniasis, an inflammatory disease that reaches the skin^{25,26,30,34}. Skin samples from healthy individuals were used as normal control for the reactions.

Table 3 – Associations involving the clinical form.

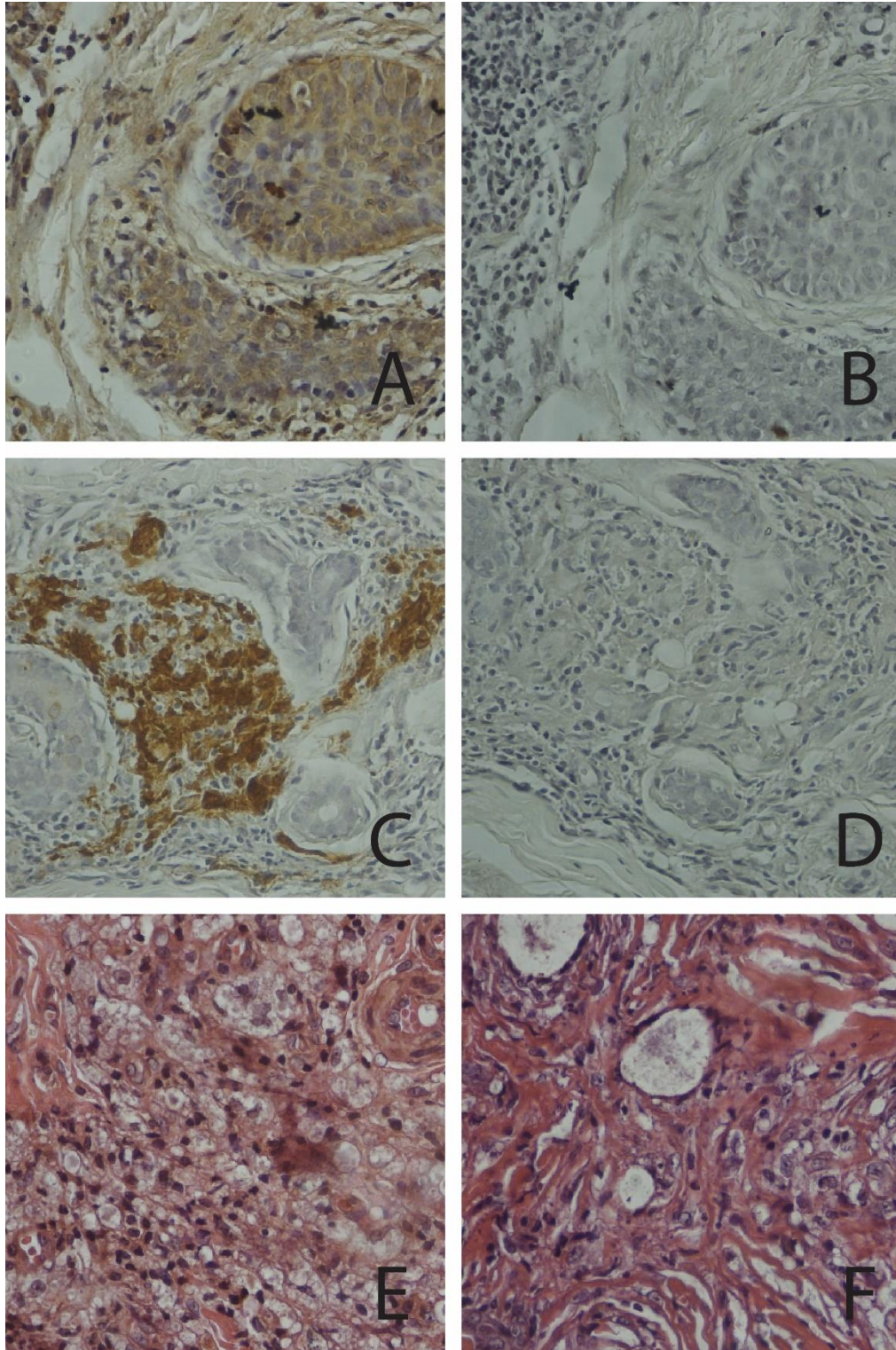
Variable	CLINICAL FORM			Value-p
	TT*	VV**	Total	
HIF-1 <i>alpha</i>				
Negative	0(0%)	4(100%)	4	<0,01
Positive	11(100%)	0(0%)	11	
Total	11	4	15	
VEGF				
Positive	11(100%)	2(100%)	13	0,04
Total	11	2	13	
iNOS				
Negative	2(20%)	3(100%)	5	0,04
Positive	8(80%)	0(0%)	8	
Total	10	3	13	

Legend: Clinical form: VV = Vichorwiana; TT = tuberculoid.

* In the TT clinical form, 4 samples were not tested for lack of material for HIF-1 α and VEGF. For iNOS, only 10 samples were tested.

** In the VV clinical form, only 2 samples were tested for VEGF and 3 for iNOS, due to lack of sufficient material in the other samples.

Figure 1 – Expression of HIF-1 α in cutaneous lesions of tuberculoid leprosy (A) and negative control without expression of HIF-1 α (B); Expression of iNOS in cutaneous lesion of leprosy tuberculoid (C) and negative control without expression of iNOS (D); VEGF expression in skin lesions of vichorwiana leprosy (E) and negative control without expression for VEGF (F). Sections A to D (x 40) were stained with immunoperoxidase and Hematoxylin. Sections E and F (x 40) were stained with immunoperoxidase and Hematoxylin and Eosin.



Source: Author.

4 DISCUSSION

Biomarkers are indicators that signal a normal or pathological process²⁸. Endothelium activation produces a vast amount of molecules that influence the pathogenesis of leprosy, thus being considered an important factor to be studied in this pathology. Studies on material of human lesions may help to obtain greater clarification of the pathogenesis.

The activation of the HIF-1 α is essential for the bactericidal capacity of phagocytes, due to the production of several effector molecules that participate in the defense mechanisms of the individual infected^{12,13}, leading to the induction and stimulation of molecules such as iNOS and VEGF^{19, 21,31,32}.

The expression of the HIF-1 α is induced by a series of cellular stresses, such as the activation of the oxidative stress pathway under infection^{33,45}. The increase in oxidative stress has been observed in leprosy. The deregulation or dysfunction of the HIF-1 α may interrupt this signaling cell transduction in the host responses to the infection by *M. Leprae*^{27,29}.

There are no reports in the literature on the expression of HIF-1 α in biopsies of cutaneous lesions of leprosy, little is known about the role of the HIF-1 α in this pathology and this study brings unprecedented results on this marker in leprosy.

Studies with HIF-1 α in leprosy are scarce, but it is possible to find studies with the HIF-1 α and other pathogens that present granulomatous response. One study showed that in the cutaneous leishmaniasis induced by *Leishmania Major* the HIF-1 α had a protective role, while in visceral leishmaniasis the HIF-1 α showed a harmful role contributing to the chronicity of the infection in mice¹⁶. Another study with *Leishmania Donovanii* showed that the growth of the intracellular parasite was favored in the presence of HIF-1 α , moreover, the infection by *L. Donovanii* was able to increase the transcription of HIF-1 α and its stabilization, thus the HIF-1 α a factor of protection for the parasite¹³.

Our study demonstrated the role of HIF-1 α in leprosy skin specimens and was strongly positive in the tubercular leprosy (TT) samples, and negative in the virchowian (VV) samples, these findings may suggest that the HIF-1 α can be related to the protection of the individual against the virchowian form of leprosy, since patients with TT form have resistance to the bacilo^{35,36}.

Authors have demonstrated a positive correlation between iNOS and HIF-1 α , which amplifies the activation of macrophages, thus controlling the infection by *Mycobacterium tuberculosis* via induction of IFN γ ¹⁷. Other authors studied the zebrafish infected with *Mycobacterium marinum* and the signaling of HIF-1 α and found that the HIF-1 α , when stabilized in the early phases of the infection, can decrease the bacterial load in the host through the action of the iNOS¹⁵.

Our studies showed the presence of iNOS in cutaneous specimens of TT leprosy, only two TT samples were negative for iNOS, while the samples of Virchowian, reactional type 2 and indeterminate lesions did not present the presence of iNOS. Our findings suggest that iNOS may be related to protection against the Virchowian form of this pathology, also the HIF-1 α , since patients with TT form have higher resistance to bacilo^{35,36} and corroborate with previous studies that showed the Presence of iNOS in cutaneous biopsies of patients with type 1 leprosy reaction (RR), in general, TT patients who evolve to a reactional condition, tend to evolve to type 1 or reverse reaction (RR)^{18,20,37}. Belone, (2004) also evidenced the expression of iNOS, by means of immunohistochemistry, in cutaneous biopsies of virgin treatment individuals, in greater amount in TT patients than in the other groups studied by him (DT, TR and DTR)³⁸. On the other hand, De Sousa et al, (2017), in his study involving 33 patients, being 17 of the TT form and 16 of the VV form, showed an increase in the iNOS in leprosy virchowiana³⁹.

Adhesion molecules have an important role in directing leukocytes to inflammatory sites. It is known that VEGF is an angiogenesis factor and is increased in granulomatosa inflammation²², and studies in melanomas reveal that VEGF is a factor of poor prognosis and is expressed in high concentrations⁴⁰. Its increase was also observed in granulomatous diseases as in active pulmonary tuberculosis in relation to old tuberculosis and aguda⁴¹ bronchitis and in pulmonary disease caused by *Mycobacterium avium*, which led to the development of chronic inflammation, in addition suggested that VEGF levels are related to the extent of the lesions granulomatosas⁴².

We verified in our studies the presence of VEGF in the TT and VV forms of leprosy skin biopsies, which are compatible with the findings of Soares et al, 2013 who observed through cutaneous biopsies of leprosy that angiogenesis is present in all Forms of leprosy, including in the reactional stages⁴³. The findings of Soares et al, 2013, are also compatible with the findings of Fiallo et al, 2002, Khadge et al, 2015

and Nogueira, Latini, Nogueira, 2016, where the first two studies showed an increase in the presence of VEGF in the Type 1 leprosy reaction (RR), while the The third study showed an increase in VEGF in non-reactive forms of leprosy^{23,44,22}. These findings suggest that there is an increase in vascular permeability in the clinical forms of leprosy, however we did not identify differences between clinical forms.

The perspective suggests more detailed studies on the HIF-1 α , VEGF, and iNOS in non-reactive leprosy lesions and its relationship with the emergence of reactional forms of leprosy, as well as the role of the HIF-1 α in the different clinical forms should be more explored. of leprosy in order to contribute to the prognosis of this pathology.

5 CONCLUSION

The findings showed that the HIF-1 α was expressed in all tuberculoid leprosy samples, while there was no positivity in virchowian leprosy, as well as iNOS that was expressed in most of the tuberculoid leprosy samples suggesting that the HIF-1 α and iNOS may be related to a protection against the disseminated or Virchowian form of leprosy. VEGF, in turn, was expressed in all forms of leprosy analyzed (vichorwiana, tuberculoid).

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Prof^o Dr^o Luiz Gonzaga de Castro of the dermatology service of the Hospital das Clínicas of Universidade Federal de Pernambuco for having made available the material for the analyses.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

AUTHORS ' CONTRIBUTION

P.L.B.C. conceived the work and elaborated the article, data collection and experiments. F.L.M., S.G. performed the analysis and interpretation of the data.

F.J.S.R. performed the experiments and made a critical review of the article. V.M.A.C conducted a critical review of the article and approved the definitive version to be published.

ORCID

Pryscilla Layanna Bezerra de Carvalho <https://orcid.org/0000-0001-6291-3436>.

REFERENCES

1. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. (2018). Situação epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016. Boletim Epidemiológico. 49:1-15.
2. Ministério da Saúde. (2019). Hanseníase: o que é, causas, sinais e sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Saúde de A a Z. Disponível em <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/hanseniaze>>. Acesso em: 13 de jul de 2019.
3. Organização Pan-Americana Da Saúde/Organização Mundial Da Saúde. (2017). OPAS/OMS apresenta estratégia global e projeto para livrar Brasil da hanseníase. Disponível em: <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5531:opas-oms-apresenta-estrategia-global-e-projeto-para-livrar-brasil-da-hanseniaze&Itemid=812>. Acesso em 06 de fev de 2018.
4. Organização Mundial Da Saúde. Estratégia global para hanseníase 2016–2020: Aceleração rumo a um mundo sem hanseníase. (2017). Nova Deli: Organização Mundial da Saúde, Escritório Regional para o Sudeste Asiático. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254907/9789290225881-por.pdf;jsessionid=98ED9950FEFA867D9C3325DDD39D80BE?sequence=8>>. Acesso em 13 de jul de 2019.
5. Araújo MG. (2005). Hanseníase no Brasil. *Revi Soc Bras Med Trop*, 36(3):373–382. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822003000300010>.
6. SINAN/SVS-MS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Sinan Net 2019. Disponível em <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/17/Registro-ativo-n--mero-e-percentual--Casos-novos-de-hansen--ase-n--mero--coeficiente-e-percentual--faixa-et--ria--classifica----o-operacional--sexo--grau-de-incapacidade--contatos-examinados--por-UF-regi--es-Br-2018.pdf>>. Acesso em 22/08/2019.
7. Portal Brasil, Novos casos de hanseníase registram redução de 34% na última década. 2017. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2017/01/novos-casos-de-hanseniaze-registram-reducao-de-34-na-ultima-decada>>. Acesso em 08 de maio de 2017.
8. Sugita Y. (1995). Leprosy. *Clinics in Dermatology*, 13(3):235-243.
9. Mendonça, VA, Melo GEBA, Teixeira AL, Costa RD, Antunes CM, et al. (2008). Imunologia da hanseníase. *An Bras Dermatol*, 83(4):343–350. <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962008000400010>.
10. Vazqu  ez CMP, Netto RSM, Barbosa KBF, et al. (2014). Micronutrients influencing the immune response in leprosy. *Nutr Hospi*, 29(1):26-36. doi:10.3305/nh.2014.29.1.6988.
11. Cardoso MS, Silva TM, Resende M, Appelberg R, Borges M. (2015). Lack of the transcription factor hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in macrophages

- accelerates the necrosis of *Mycobacterium avium*-induced granulomas. *Infect Immun* 83:3534–3544. doi:10.1128/IAI.00144-15.
12. Zinkernagel AS, Johnson RS, Nizet V. (2007). Hypoxia inducible factor (HIF) function in innate immunity and infection. *J Mol Med*, 85: 1339. <https://doi.org/10.1007/s00109-007-0282-2>.
 13. Singh AK, Mukhopadhyay C, Biswas S, Singh VK, Mukhopadhyay CK. (2012). Intracellular Pathogen *Leishmania donovani* Activates Hypoxia Inducible Factor-1 by Dual Mechanism for Survival Advantage within Macrophage. *PLoS ONE*, 7(6): e38489. doi:10.1371/journal.pone.0038489.
 14. Gordan JD & Simon MC. (2007). Hypoxia-inducible factors: central regulators of the tumor phenotype. *Curr Opin Genet Dev*, 17(1): 71–77. doi: 10.1016/j.gde.2006.12.006.
 15. Elks PM, Brizee S, Van der Vaart M, Walmsley SR, Van Eeden FJ, et al. (2013), Hypoxia Inducible Factor Signaling Modulates Susceptibility to Mycobacterial Infection via a Nitric Oxide Dependent Mechanism. *PLoS Pathog*, 9(12): e1003789. doi:10.1371/journal.ppat.1003789.
 16. Hammami A, Abidin BM, Charpentier T, Fabie´ A, Duguay A-P, Heinonen KM, et al. (2017) HIF-1 α is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*, 13(9): e1006616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006616>.
 17. Braverman J. & Stantey SA. (2017). Nitric Oxide Modulates Macrophage Responses to *Mycobacterium tuberculosis* Infection through Activation of HIF-1 α and Repression of NF-Kb. *J Immunol*, 2017 Sep 1; 199(5): 1805–1816. doi:10.4049/jimmunol.1700515.
 18. Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. (2001). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br J Dermatol*. 145(5):809-15. doi:1046/j.1365-2133.2001.04491.x.
 19. Hellwig-Bürgel T, Stiehl DP, Wagner AE, Metzen E, Jelkmann W. (2005). Review: Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1): A Novel Transcription Factor in Immune Reactions. *J Interferon Cytokine Res*. 2005 Jun;25(6):297-310. doi:10.1089/jir.2005.25.297.
 20. Lockwood DNJ, Suneetha L, Sagili KD, Chaduvula MV, Mohammed I, et al. (2011). Cytokine and Protein Markers of Leprosy Reactions in Skin and Nerves: Baseline Results for the North Indian INFIR Cohort. *PLoS Negl Trop Dis* 5(12): e1327. doi:10.1371/journal.pntd.0001327.
 21. Nizet V & Johnson RS. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9(9): 609–617. doi:10.1038/nri2607.
 22. Nogueira MRS, Latini ACP, Nogueira MES. (2016). The involvement of endothelial mediators in leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 111(10): 635-641. doi: 10.1590/0074-02760160122.
 23. Fiallo P, Clapasson A, Favre A, Pesce C. (2002). Overexpression of vascular endothelial growth factor and its endothelial cell receptor KDR in type 1

- leprosy reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 66(2):180–185. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.180.
24. Ferro AB. (2014). *Imunohistoquímica*. Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Lisboa, Lisboa. p. 1-147. ISBN: 978-989-20-5416-2.
 25. Rocha FJS, et al. (2018). Expression on hypoxia-inducible factor-1 α in human tegumentary leishmaniosis caused by *Leishmania braziliensis*. *Annals of Parasitology*. 64(1):73–76. doi: 10.17420/ap6401.136.
 26. Santiago RC. (2013). A relação arginase-óxido nítrico na infecção experimental por *Leishmania braziliensis*. 68f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Curso de Pós-Graduação em Patologia. Salvador, 2013.
 27. Dong SY, et al. (2016). The epigenetic regulation of HIF-1 α by SIRT1 in MPP(+) treated SH-SY5Y cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 470:453–459. doi: 10.1016 / j.bbrc.2016.01.013
 28. Andrade BB, Barral-Netto M. (2011). Biomarkers for susceptibility to infection and disease severity in human malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(Suppl. I): 70-78. doi: 0.1590/S0074-02762011000900009.
 29. Rajagopalan S, Rane A, Chinta SJ, Andersen JK. (2016). Regulation of ATP13A2 via PHD2-HIF1 α signaling is critical for cellular iron homeostasis: Implications for Parkinson's disease. *J. Neurosci.* 36:1086–1095. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3117-15.2016.
 30. Fraga CAC, Oliveira MVM, de Alves LR, et al. (2012). Immunohistochemical profile of HIF-1 α , VEGF-A, VEGFR2 and MMP9 proteins in tegumentary leishmaniasis. *An Bras Dermatol.* 87(5), 709–713. doi:10.1590/s0365-05962012000500006.
 31. Konner J, Dupont J. (2004). Use of soluble recombinant decoy receptor vascular endothelial growth factor trap (VEGF Trap) to inhibit vascular endothelial growth factor activity. *Clin Colorectal Cancer*. 4 Suppl 2:S81-5. doi: 10.3816/CCC.2004.s.013.
 32. Majmundar AJ, Wong WJ, Simon MC. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Molecular Cell*. 40(2), 294–309. doi: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.
 33. Movafagh S, Crook S, Vo K. (2015). Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by reactive oxygen species: New developments in an old debate. *J. Cell. Biochem.* 116:696–703. Doi: 10.1002/jcb.25074.
 34. Halpern I. (2012). Células dendríticas plasmocitóides, dendrócitos dérmicos Fator XIIIa positivos, macrófagos e expressão da forma induzida da óxido nítrico sintase na resposta tecidual cutânea da leishmaniose tegumentar americana. 153f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Programa de Patologia. São Paulo, 2012.
 35. Aktan F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. *Life Sciences*, 2004; 75:639–653. doi: 10.1016/j.lfs.2003.10.042.

36. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para o Controle de Hanseníase. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.
37. Talhari S. et al. Hanseníase. 4. ed. Manaus: Ed. Fundação Medicina Tropical, 2006.
38. Belone AFF. (2004). Hanseníase na faixa tuberculóide: estudo comparativo entre manifestações tórpidas e reacionais através de avaliações de antígenos micobacterianos e de parâmetros representativos de hipersensibilidade mediada por células, em biópsias cutâneas. p. 32-64. Manuscrito: Equipe Técnica de Patologia, Instituto Lauro de Souza Lima. CxP 3012. Bauru. SP. Brasil. 17034-971.
39. de Sousa JR, de Sousa RPM, de Souza Aarão TL, et al. (2017). Response of iNOS and its relationship with IL-22 and STAT3 in macrophage activity in the polar forms of leprosy. *Acta Trop.* 171:74-79. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.03.016.
40. Daud A, Kluger HM, Kurzrock r, et. al. (2017). Phase II randomised discontinuation trial of the MET / VEGF receptor inhibitor cabozantinib in metastatic melanoma. *Br J Cancer.* 116(4):432–440. doi: 10.1038/bjc.2016.419.
41. Matsuyama W, Hashiguchi T, Matsumuro K, et al. (2000). Increased Serum Level of Vascular Endothelial Growth Factor in Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 162(3):1120–1122. doi: 10.1164/ajrccm.162.3.9911010.
42. Nishigaki Y, Fujiuchi S, Fujita Y, et al. (2006). Increased serum level of vascular endothelial growth factor in Mycobacterium avium complex infection. *Respirology.* 11(4):407-13. doi: 10.1111/j.1440-1843.2006.00863.x.
43. Soares CT, Rosa PS, Trombone AP, et. al. (2013). Angiogenesis and Lymphangiogenesis in the Spectrum of Leprosy and Its Reactional Forms. *PLoS One.* 8(9):e74651. doi: 10.1371/journal.pone.0074651.
44. Khadge S, Banu S, Bobosha K, et. al. (2015). Longitudinal immune profiles in type 1 leprosy reactions in Bangladesh , Brazil , Ethiopia and Nepal. *BMC Infect Dis.* 15:477. doi: 10.1186/s12879-015-1128-0.
45. Deshmane SL, et al (2009). Activation of the oxidative stress pathway by HIV-1 Vpr leads to induction of hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *J. Biol. Chem.* 284:11364–11373. doi: 10.1074/jbc.M809266200.
46. Quaresma, JAS, de Oliveira Lima, LW, Fuzii, HT, Libonati, RMF, Pagliari, C, & Duarte, MIS (2010). Immunohistochemical evaluation of macrophage activity and its relationship with apoptotic cell death in the polar forms of leprosy. *Microbial Pathogenesis,* 49(4), 135–140. doi:10.1016/j.micpath.2010.05.003

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação in situ do fator de crescimento endotelial vascular e fator induzido por hipóxia 1-alpha nas lesões de pacientes com hanseníase.

Pesquisador: Priscilla Layanna Bezerra de Carvalho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 88560218.8.0000.5208

Instituição Proponente: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.720.590

Apresentação do Projeto:

O Protocolo da Pesquisa intitulada

AVALIAÇÃO IN SITU DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E DO FATOR INDUZIDO POR HIPÓXIA 1-ALPHA NAS LESÕES DE PACIENTES COM HANSENÍASE tem como finalidade a dissertação de mestrado da mestranda Priscilla Layanna Bezerra de Carvalho do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da UFPE sob a orientação da Profa. Vláudia Maria Assis Costa e coorientação da Profa. Francisca Janaina Soares Rocha. Constam na equipe de pesquisa Selma Giorgio, Fábio Melo e Jessica Juliana do Nascimento. Está registrado no CAAE: 88560218.8.0000.5208.

Objetivo da Pesquisa:

São apresentados como objetivos primários caracterizar in situ os marcadores HIF-1, VEGF e iNOS em espécimes cutâneas de hanseníase (vichorwiana, tuberculoide, dimorfo) e o risco de desenvolver as formas reacionais tipo 1 e tipo 2.

Como objetivos secundários caracterizar in situ células que participam do infiltrado inflamatório nas lesões cutâneas; avaliar in situ os biomarcadores HIF-1 e VEGF; avaliar a expressão de iNOS nas diferentes formas clínicas da hanseníase.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 2.720.590

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências

Considerações Finais a critério do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_984274.pdf	13/06/2018 14:27:31		Aceito
Outros	CARTADERESPOSTAASPENDENCIAS.docx	13/06/2018 14:26:14	Priscilla Layanna Bezerra de Carvalho	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br