

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

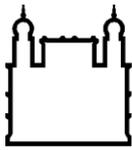
DÉBORA SANTOS DA SILVA

Estudo das Alterações na Cascata de Coagulação em Pacientes do Mal de Hansen

Orientador: Prof. Dr. Flavio Alves Lara

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

DÉBORA SANTOS DA SILVA

Estudo das Alterações na Cascata de Coagulação em Pacientes do Mal de Hansen

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

Orientador: Prof. Dr. Flavio Alves Lara

RIO DE JANEIRO

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S586 Silva, Débora Santos da

Estudo das alterações na cascata de coagulação em pacientes do Mal de Hansen / Débora Santos da Silva. – Rio de Janeiro, 2013.

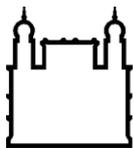
xvii, 84 f.: il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013

Bibliografia: f. 72-84

1. Hanseníase. 2. Coagulação. 3. Proteoma. I. Título.

CDD 616.998



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: Débora Santos da Silva

Estudo das Alterações na Cascata de Coagulação em Pacientes do Mal de Hansen

ORIENTADOR: Prof. Dr. Flavio Alves Lara

Aprovada em: 07/11/2013

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Roberta Olmo Pinheiro - Presidente – IOC/FIOCRUZ

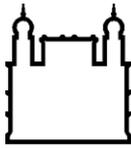
Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro - IBqM/UFRJ

Prof. Dr. Jose Augusto da Costa Nery – IOC/FIOCRUZ

Prof. Dr. Danuza Esquenazi - IOC/FIOCRUZ (suplente)

Prof. Dr. Ana Maria Freire Tovar – IBqM/UFRJ (suplente e revisora)

Rio de Janeiro, 07 de novembro de 2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

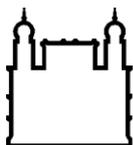
Fundação Oswaldo Cruz

Estudo das Alterações na Cascata de Coagulação em Pacientes do Mal de Hansen

RESUMO
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Débora Santos da Silva

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que afeta a pele e os nervos periféricos, causando deformidades e incapacidades físicas devido aos danos nos nervos. A hanseníase é causada pela micobactéria *Mycobacterium leprae*, um patógeno intracelular obrigatório. A resposta a infecções bacterianas, virais ou parasitárias é acompanhada por diversas alterações relacionadas à hemostasia, como por exemplo, aumento nos níveis de fibrinogênio. Compreender de que modo essas alterações são induzidas nessas condições pode ser relevante para o desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas. Na preparação do soro de pacientes hansênicos observamos algumas vezes a formação de um sólido coágulo lipídico, que aqui denominamos Coágulo Hansênico. Inicialmente atribuímos a uma exacerbação dos lipídios séricos a formação desse coágulo. Dos cerca de 2000 pacientes que foram atendidos no ambulatório Souza Araújo, entre os anos de 2009 e 2013, 35 apresentaram o coágulo hansênico (1,75%), dos quais 35% estavam em reação tipo II (ENH) na data da coleta. A análise desse coágulo por cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC), eletroforese e espectrometria de massa, mostrou que além de uma grande concentração de lipídeos, o coágulo hansênico contém alto teor de fibrina/fibrinogênio e de imunoglobulinas. Diante disso, o principal objetivo deste trabalho foi realizar a análise proteômica do coágulo hansênico e quantificar, no soro e plasma dos pacientes multibacilares em reação tipo II ou multibacilares não reacionais, moléculas que poderiam estar envolvidas na formação desse coágulo. Verificamos que a presença de coágulo hansênico está associada a níveis elevados de fator de von Willebrand e fator tecidual. Além disso, pacientes multibacilares reacionais apresentaram maiores níveis de fibrinogênio quando comparados aos pacientes multibacilares não reacionais. Acreditamos que nos pacientes multibacilares a alta carga bacilar e a resposta imune à mesma são responsáveis pelo dano tecidual e consequente liberação de moléculas de matriz extracelular, acarretando a exacerbação do processo de coagulação observada nos mesmos.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Coagulation Cascade Changes on Leprosy Patients

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Débora Santos da Silva

Leprosy is a chronic infectious disease that affects the skin and peripheral nerves, causing deformities and disabilities due to nerve damage. Leprosy is caused by *Mycobacterium leprae* an obligate intracellular pathogen. Responses to bacterial, viral or parasitic infections are accompanied by several changes on hemostasis parameters, such as increased levels of fibrinogen. Understanding how these changes are induced in these conditions may be relevant to the development of new therapeutic tools. In preparing serum of leprosy patients, sometimes it was observed formation of a lipidic solid clot, here called Leprosum Clot, initially attributed to an exacerbation of serum lipids. Of the approximately 2000 patients treated in Souza Araújo Ambulatory (IOC/Fiocruz), between the years 2009 and 2013, 35 showed the leprosum clot (1.75%), of which about 35% were in type II reaction (ENL) on the collect date. The analysis of such clot by high-performance thin layer chromatography (HPTLC), electrophoresis and mass spectrometry showed that in addition a high lipid contents, the leprosum clot contains high fibrin/fibrinogen and immunoglobulin levels. Therefore, the aim of this study was to perform a proteomic analysis of leprosum clot and quantify, in serum and plasma from multibacillary type II reactional patients and multibacillary not reactive ones, molecules that could be involved in the generation of this clot. It was observed that formation of leprosum clot is associated to elevated levels of von Willebrand factor and tissue factor. However, reactional multibacillary patients showed fibrinogen higher levels when compared to not reactive ones. We believe that in multibacillary patients the high bacterial load and immune response to it are responsible for tissue damage and subsequent release of extracellular matrix molecules, resulting in the coagulation exacerbation observed in these patients.

Aos meus pais, por tudo o que representam para mim...

Ao autor e consumidor da minha fé; Aquele que me sustenta, quando minhas forças parecem estar no fim. Toda a minha vida seria insuficiente para agradecer por mais essa vitória (Que darei eu ao Senhor por todos os benefícios que me tem feito? Salmos 116.12).

Ao meu orientador, Dr. Flavio Alves Lara (chefinho pros íntimos), pela confiança, pelos preciosos ensinamentos e já ia me esquecendo por quase me deixar louca com as “novas ideias pra colocar no projeto”.

À Dra Danuza Esquenazi, pela valiosa colaboração na 2ª metade do projeto e pela co-orientação, mesmo que informal e aos seus alunos Luciana e Pedro, pela ajuda na hora da consulta aos prontuários.

Ao Dr. José Augusto Nery, pelo seu carinho e incentivo.

Ao Dr. Sérgio Antunes, pela ajuda na leitura das lâminas de histoquímica.

A todos os médicos e enfermeiros do ambulatório Souza Araújo.

A todos da sala 6 do Pavilhão Hanseníase, especialmente Eliane e Hanna.

À Dra. Maria Cristina Pessolani, pelos conselhos.

A toda equipe do Laboratório de Toxinologia: Dr. Perales, por me receber em seu laboratório, Dr. André Teixeira, principalmente pela paciência. À Viviane Tostes, Joelma Saldanha e Monique Nunes por toda ajuda. A todas as meninas do lab, principalmente a Vivi Bastos, pela amizade.

A toda equipe do Laboratório de Tecido Conjuntivo (IBqM/UFRJ): Dra. Ana Tovar por todos os ensinamentos e a Lisandra, por toda ajuda.

Aos membros da banca avaliadora, por tão prontamente terem aceitado participar.

A toda equipe LAMICEL: Dra. Márcia Berredo, por toda ajuda com a análise das imagens dos géis bidimensionais. Dra. Luciana por ser sempre tão prestativa (sentiremos saudades!). Dra. Cristiana Macedo, por contagiar qualquer um com a sua risada! Sério, não há mal-humor que resista! Ao João, por toda ajuda. “Aos meninos” André (mala-mor da minha vida e sim, eu já aprendi que o prédio da Hanseníase tem banheiro), Léo, Fabrício e Rodrigo, por infernizarem minha vida, brincadeira, já não imagino meu dia sem vocês! As minhas queridas – Livia, Robertha, Chyntia, Jéssica, Thabatta e especialmente Fernanda (E na angústia nasce o irmão – Provérbios 17.17). À Rychelle, Karina, Sabrina (pelas inúmeras caixas de tips), Camila, Paula, Larissa, Dra. Rosana, Dr. Caetano, Adriano, Arthur, Thiago, Antônio Marcos pela agradável companhia. Amo cada um de vocês! Obrigado por esses 4 anos de convivência (e por não me deixarem mais almoçar sozinha - piada interna).

Aos meus amigos da Uerj: Cíntia, Ulisses, Janaína Evelin, Jaqueline, Patrícia, Liane, Ellen, Andreza, Julia e Viviane, por esses 8 anos de amizade. Amo vocês!!!

Aos meus pais Alcemar e Julia, por serem minha base, meu porto seguro e por me apoiarem incondicionalmente, às vezes, mesmo não entendendo completamente o que eu faço.

Aos meus irmãos de verdade, Lucimar, Rose, Felipe e Carlos (cunhadinho) e aos de coração, Monique e Victor (Maicon).

A Igreja Evangélica Assembleia de Deus em Queimados, pelas constantes orações; aos meus pastores Gilson Rodrigues e Mariza Rodrigues, por cuidarem tão bem de mim.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, pelas excelentes aulas ministradas.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, pela bolsa de estudos.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2D-E	Eletroforese em 2 dimensões
AAF	Anticorpo Antifosfolípídeo
aPTT	Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada
BAAR	bacilo álcool-ácido resistente
BB	Borderline-Borderline
BL	Borderline-Lepromatoso
BT	Borderline-Tuberculóide
CHAPS	(3-[(3-colamidopropil)-imetilamonio]-1-propanosulfonato)
CID	Coagulação intravascular disseminada
DTT	Ditioteitrol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
FT	Fator Tecidual
GAG	Glicosaminoglicano
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IB	Índice bacteriano
IFN- γ	Interferon-gama
IL-10	Interleucina 10
IL-1 β	Interleucina - 1 – beta
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LL	Lepromatoso-Lepromatoso
<i>M. leprae</i>	<i>Mycobacterium leprae</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MALDI-TOF-TOF	Espectrometro de massas do tipo "Matrix-assisted laser desorption/ionization - time-of-flight (Dessorção/ionização a laser assistida por matriz - tempo de Vôo)
MB	Multibacilar
MEC	Matriz extracelular
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz 9
MS/MS	Espectrometria de massas acoplados
°C	Graus Célcus
OMS	Organização Mundial da Saúde
PB	Paucibacilar
PBS	Salina tamponada com fosfato
PGL-1	Glicolípídeo fenólico 1
PQT	Poliqumioterapia
PT	Tempo de Protrombina

RR	Reação Reversa
SAA	Síndrome do Anticorpo Antifosfolipídeos
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TT	Tuberculóide-Tuberculóide
TVP	Trombose Venosa Profunda

Tabela 1.1	Fases do processo hemostático (adaptado de Riddel <i>et al</i> 2007)	15
Tabela 3.1	Parâmetros utilizados nas buscas com o programa Mascot	29
Tabela 4.1	Sumário de proteínas identificadas somente no coágulo hansênico ou coágulo controle	38
Tabela 4.2	Sumário de proteínas identificadas por MS/MS que estavam super expressas ou <i>over expressas</i> no coágulo hansênico em relação ao coágulo controle	39
Tabela 4.3	Tempo de Protrombina e Tromboplastina Parcial Ativada em pacientes multibacilares reacionais e não reacionais	48

INTRODUÇÃO

1.1	Mapa mostrando as taxas globais de prevalência da hanseníase no ano de 2012	2
1.2	Coeficiente geral de detecção da hanseníase	3
1.3	Modelo esquemático do envelope celular do <i>Mycobacterium leprae</i> (Adaptado de Vissa e Brennan, 2001)	5
1.4	Cultivo de <i>M. leprae</i> em pata de camundongo	7
1.5	Classificação de Ridley-Jopling	9
1.6	Esquema demonstrando a cascata de coagulação	14
1.7	Representação esquemática de vias moleculares na coagulação intravascular disseminada (DIC)	17
1.8	Imagem de microscopia ótica onde seta aponta trombo em vaso sanguíneo, contendo numerosos bacilos de Hansen	21
1.9	Aparência da “massa lipídica” observada durante a coleta de soro de pacientes de hanseníase	22

METODOLOGIA

3.1	Coágulo gerado em plasma de indivíduos saudáveis	25
-----	--	----

RESULTADOS

4.1	2D-Eletroforese do extrato proteico obtido do coágulo hansênico	33
4.2	HPTLC (<i>high performance thin layer chromatography</i>) dos lipídeos extraídos do coágulo hansênico e coágulo controle.	34

4.3	SDS-PAGE comparativa dos extratos protéicos do coágulo de paciente e de coágulo induzido.	35
4.4	Géis bidimensionais (2D-Eletroforese) representativos do perfil proteico do coágulo hansênico e coágulo controle	36
4.5	Análise comparativa das proteínas do coágulo hansênico e coágulo controle.	37
4.6	Níveis de IgG B2GPI no soro de pacientes de hanseníase	41
4.7	Níveis de IgM Anticardiolipina no soro de pacientes de hanseníase	42
4.8	Nível de fatores de coagulação no soro de pacientes de hanseníase.	43
4.9	Níveis de MMP-9 no soro dos pacientes que apresentaram o Coágulo Hansênico	45
4.10	Níveis de fibrinogênio no soro de pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais	49
4.11	Níveis de Dímero-D no soro de pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais.	50
4.12	Lipidograma de pacientes multibacilares em reação tipo II e não reacionais.	51
4.13	Níveis de Fator de Von Willebrand e Fator Tecidual no soro de pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais.	53
4.14	Níveis de IgM Anticardiolipina no soro de pacientes de multibacilares em reação tipo II ou não reacionais	54
4.15	Análise dos níveis de Metalloproteínase-9 (MMP-9) no soro de pacientes hansênicos multibacilares em reação tipo II ou não reacionais	55
4.16	Expressão de fator tecidual em lesões de pele de paciente multibacilar em reação tipo II.	57
4.17	Eletroforese de Glicosaminoglicanos extraídos do coágulo hansênico e coágulo controle	59
4.18	Histopatologia de lesão de pele de paciente multibacilar em reação tipo II	60
4.19	Histopatologia de lesão de pele de paciente multibacilar não reacional	61

DISCUSSÃO

5.20	Proposta mecanística das alterações de coagulação observadas na Hanseníase	70
------	--	----

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiii
SUMÁRIO	xvi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hanseníase	1
1.1.1 Distribuição Geográfica Atual	2
1.1.2 O <i>Mycobacterium leprae</i>	3
1.1.2 Características Gerais e Classificação	8
1.1.4 Episódios Reacionais	10
1.1.5 Tratamento	11
1.2 Hemostasia e Coagulação	12
1.3 Inflamação x Coagulação	15
1.4 Coagulação e doenças micobacterianas	19
1.4.1 Justificativa	22
2) OBJETIVO GERAL	23
2.1 Objetivos específicos:	23
3. MATERIAIS E MÉTODO	24
3.1 Seleção e classificação dos pacientes	24
3.2 Obtenção de extrato proteico, determinação da concentração de proteínas e SDS-PAGE	26
3.3 Eletroforese bidimensional	26
3.3.1 Focalização Isoelétrica (1ª dimensão)	26
3.3.2 Eletroforese em SDS-PAGE (2ª dimensão)	27
3.3.3 Coloração dos géis e análise das Imagens	27
3.3.4 Retirada e processamento dos spots; identificação por espectrometria de massas	28
3.4 Ensaio Imunoenzimático (ELISA)	29
3.5 Colaboração Fiocruz-Laboratório Sérgio Franco	30
3.6 Processamento de rotina e colorações de fragmentos de pele obtidos por biópsia	30
3.7 Imunofluorescência	31
4. RESULTADOS	32
4.1 Perfil bidimensional de proteínas do agregado lipídico	32
4.2 Perfil bidimensional de proteínas do coágulo hansênico e coágulo controle	35

4.3 Avaliação dos níveis de Imunoglobulinas Reativas a Fosfolipídeos.	40
4.4 Avaliação de fatores envolvidos na coagulação em soro de pacientes com coágulo hansênico	43
4.5 Avaliação dos níveis séricos de MMP-9 em pacientes com coágulo hansênico	45
4.6 Análise dos parâmetros de coagulação em pacientes multibacilares em reação hansênica tipo II e pacientes não reacionais.	46
4.7 Avaliação dos lipídeos séricos em pacientes multibacilares não reacionais e em reação tipo II	51
4.8 Avaliação dos níveis de Fator de Von Willebrand e Fator Tecidual no soro de pacientes multibacilares não reacionais e em reação tipo II	53
4.9 Avaliação dos níveis de imunoglobulinas reativas a fosfolipídeos no soro de pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais	54
4.10 Avaliação dos níveis séricos de MMP-9 em pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais	55
4.11 Análise da expressão de fator tecidual nas lesões de pele de pacientes de hanseníase	56
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1.1 Hanseníase

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica que causa incapacidades e deformações físicas devido a danos nos nervos periféricos (Jopling, 1983). É causada pelo *Mycobacterium leprae*, sendo este um bacilo álcool-ácido resistente, de lento crescimento, parasita intracelular obrigatório de células do sistema mononuclear fagocitário e células de Schwann. Dos tempos bíblicos ao período moderno, a hanseníase foi descrita como uma doença que causa horror por conta do estigma à aparência física do doente não tratado: lesões ulcerantes na pele, deformidades e perda das extremidades. Esta marca de desonra, relacionada ao pecado, fisicamente presente nas feridas e nos membros desfigurados do "leproso" lançou a doença ao lado mais obscuro da sociedade. Ela significou ainda ao longo de anos, exclusão do convívio social devido à única forma de tentativa de controle epidemiológico existente até meados do século 20, o isolamento nos leprosários.

A forma de contágio ainda não foi bem definida, mas acredita-se que a principal via de contaminação seja a mucosa respiratória, sendo pouco provável a transmissão de bacilos através de lesões cutâneas ulceradas (Jopling, 1983). A doença apresenta um longo período de incubação e as primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre dois a dez anos após a infecção.

O *M. leprae* tem alta infectividade e baixa patogenicidade, isto é, infecta muitas pessoas, no entanto poucas adoecem. Acredita-se que mais de 90% da população seja resistente a infecção pelo *M. leprae* e não apresente sintomas clinicamente detectáveis (Godal et al 1972).

Em 1981, a Organização Mundial da Saúde introduziu a quimioterapia combinada com três drogas, conhecida como poliquimioterapia (PQT/OMS), que consiste no uso das drogas dapsona, clofazimina e rifampicina, com o objetivo de reduzir a resistência do bacilo quando uma única droga era administrada. O sucesso da poliquimioterapia reduziu drasticamente a incidência da doença, porém o diagnóstico precoce e o controle dos episódios reacionais são desafios que precisam ser superados.

1.1.1 Distribuição Geográfica Atual

A Hanseníase possui uma vasta distribuição pelo mundo (Figura 1.1), sendo mais prevalente nos trópicos e subtropicais. De acordo com dados da OMS, a prevalência global da hanseníase no início de 2012 situou-se em 181.941 novos casos enquanto que em 2011 esse número foi de 219.075 e 228 474 em 2010 (OMS,2013). Apesar desse decréscimo, a erradicação da doença, porém, parece distante, pelo menos em alguns países. Embora haja múltiplos esforços para o combate à doença, esta continua sendo até hoje a principal causa de incapacidade física permanente dentre as doenças infectocontagiosas.

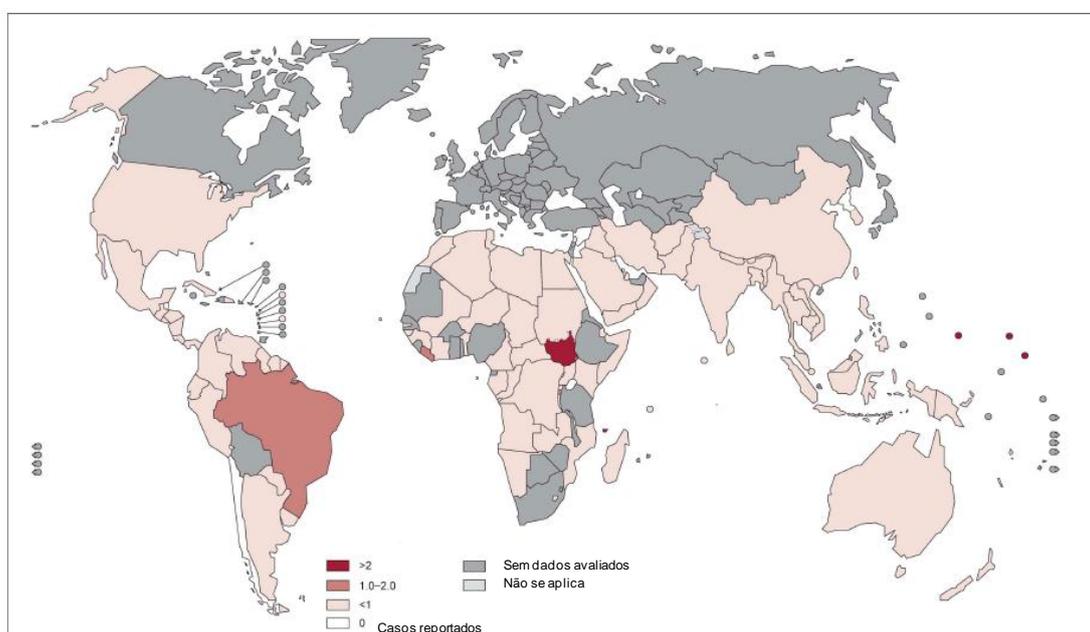


Figura 1.1: Mapa mostrando as taxas globais de prevalência da hanseníase no ano de 2012. A gradação do vermelho indica diferentes taxas de incidência, indo da menor taxa (vermelho claro/rosa, com menos de um caso relatado para cada 10 mil habitantes) a maior (vermelho escuro, apresentando mais de dois casos da doença a cada 10 mil habitantes). Em cinza estão os países em que não houve estimativa. Modificado a partir de <http://www.who.int/lep/situation/LeprosyPR2011.pdf> (OMS, 2013).

Segundo o ministério da saúde, em 2012 foram diagnosticados 33.303 casos novos no Brasil, 2.246 (7%) em menores de 15 anos. O coeficiente geral de detecção (17,2/100 mil habitantes) é considerado alto (Figura 1.2.a). Segundo os parâmetros de referência deste indicador, os estados de Rondônia, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Pará, Piauí e Maranhão foram classificados como hiperendêmicos, com mais de 40 casos novos por 100 mil habitantes, em 2011. Os estados do Rio Grande do Norte, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina apresentam média endemidade e o Rio Grande do Sul, baixa endemidade

(menos de dois casos novos por 100 mil habitantes). Os outros Estados apresentam endemicidade alta ou muito alta. No Rio de Janeiro, diversos municípios apresentam um coeficiente geral de detecção considerado muito alto para os parâmetros do Ministério da Saúde, sendo os municípios de Parati, Guapimirim e Cardoso Moreira considerados hiperendêmicos.

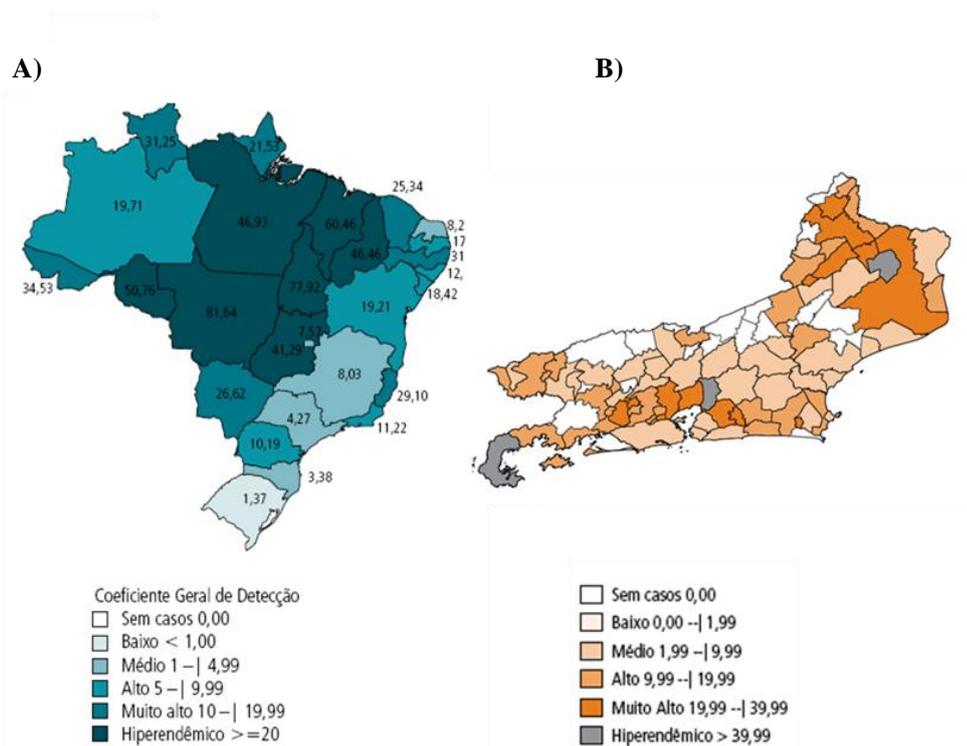


Figura 1.2: Coeficiente geral de detecção da hanseníase. A) Coeficiente geral de detecção de hanseníase por 100 mil habitantes nas Unidades da Federação em 2010. Adaptado de Ignott & Paula, 2010. B) Coeficiente geral de detecção por municípios do Rio de Janeiro em 2010 (adaptado de Secretaria de vigilância em saúde-Ministério da Saúde).

1.1.2 O *Mycobacterium leprae*

O agente etiológico da hanseníase, descrito por Gerard Henrik Armauer Hansen em 1874, foi a primeira bactéria relacionada a uma doença humana, porém até hoje ainda não é possível cultivá-lo *in vitro*, o que dificulta o estudo detalhado de seus componentes e de sua biologia.

Células de Schwann, responsáveis pela formação da bainha de mielina nos nervos periféricos, assim como macrófagos da pele são os principais alvos do *M. leprae*. Uma das características do *M. leprae* é o seu padrão de alta infectividade, e

baixa patogenicidade, ou seja, esse bacilo é capaz de infectar grande número de pessoas, mas poucos adoecem.

O *M. leprae* pertence à ordem Actinomycetales e à família Mycobacteriaceae, que possui um único gênero, denominado *Mycobacterium (fungus bacterium)*, nome proposto por Lehmann e Neumann em 1896, em referência à película formada pelo *Mycobacterium tuberculosis* na superfície de meios líquidos que era similar a produzida por alguns fungos (Baptista & Opromolla, 2000).

Possui a forma de um bastonete reto ou ligeiramente encurvado, de 1,5 a 8 µm de comprimento por 0,2 a 0,5 µm de largura. Cora-se em vermelho pela fucsina e não se descora pela lavagem com álcool ácido, sendo, portanto, um bacilo álcool-ácido resistente (BAAR) (Rees, 1985). É uma bactéria de crescimento lento, fazendo uma divisão binária a cada 12-14 dias (OMS, 1987). A temperatura ótima de crescimento do *M. leprae* é abaixo de 37° C, o que pode explicar a sua predileção por áreas superficiais do corpo como a pele e nervos periféricos (Shepard, 1965).

A parede celular micobacteriana possui características únicas, sendo impermeável a diversos compostos, uma característica responsável pela resistência a inúmeras drogas. O glicolípido fenólico 1 (PGL-1) é um antígeno bem caracterizado específico do *M. leprae* e o maior componente de sua parede celular, constituindo a camada mais externa do envoltório celular (figura 1.3).

A membrana plasmática é recoberta por uma parede celular feita de peptidoglicano associada covalentemente a galactana por uma unidade de ligação de arabinogalactana. Por sua vez, três cadeias ramificadas de arabinana são ligadas a galactana. A camada de peptidoglicano-arabinogalactana forma a zona eletrondensa. Ácidos micólicos estão ligados no final da cadeia de arabinana para formar o folheto interno da bicamada lipídica. O folheto externo é formado por ácidos micólicos de trealose monomicolato (TMMs) e ácidos micocerosícos de fitiocerol dimicocerosato (PDIMs) e glicolípido fenólico (PGLs) como indicado na figura 1.3. A bicamada forma a zona eletrontransparente. Uma capsula composta basicamente de PGLs e outras moléculas como PDIMs, PIMs (fosfatidilinositol manosídeos) e PL (fosfolípídeos) rodeiam a bactéria. Lipoglicanas como PIMs, LM (lipomanana) e LAM (lipoarabinomanana), conhecidos por se ancorarem a membrana plasmática, também são encontrados na cápsula (Ng *et al* 2000).

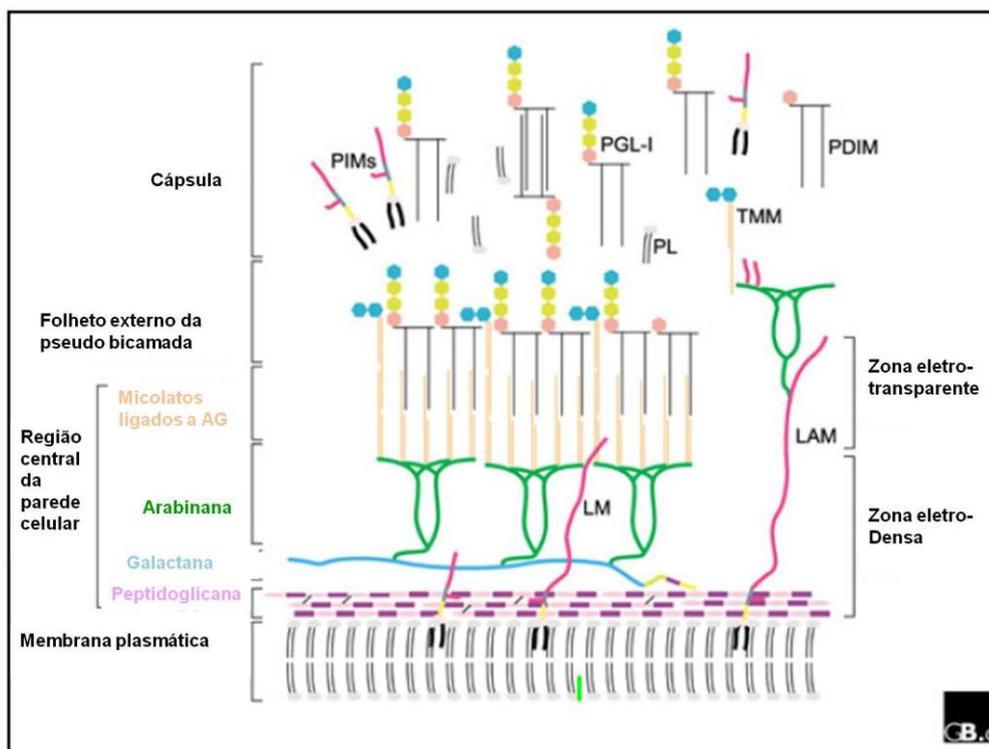


Figura 1.3: Modelo esquemático do envelope celular do *Mycobacterium leprae* (Adaptado de Vissa e Brennan, 2001)

Um marco que abriu muitas perspectivas para o entendimento da biologia deste patógeno tão peculiar foi a conclusão do sequenciamento do seu genoma (COLE *et al.*, 2001). A disponibilidade da sequência do genoma do *M. tuberculosis*, concluída em 1998 (COLE *et al.*, 1998), vem permitindo a comparação da composição genética entre estas duas espécies tão próximas de micobactérias.

Um dado surpreendente é a perda maciça de genes pelo *M. leprae*, o que poderia explicar a taxa de crescimento lenta do bacilo, assim como sua incapacidade de crescimento *in vitro*. Somente 49,5% do genoma do *M. leprae* contém genes que codificam para proteínas enquanto que 91% do genoma do *M. tuberculosis* corresponde a sequências codificantes.

O genoma do *M. leprae* contém 1.116 pseudogenes ou genes degenerados, assim denominados devido à perda de regiões necessárias para a sua transcrição e/ou tradução. Esta característica torna o *M. leprae* uma exceção entre as bactérias, sendo este grau de redução de genes somente observada, de forma menos acentuada, em *Rickettsia prowazekii*, onde 24% do seu genoma é constituído de sequências não codificantes e pseudogenes (Andersson & Andersson, 2001).

Uma análise funcional dos genes preservados pelo *M. leprae* revela a integridade da maioria das vias anabólicas, e deleções em algumas vias catabólicas essenciais. A redução da quantidade de pseudo-genes assim como seu baixo teor de GC, podem ser explicadas pela longa adaptação à vida no interior das células humanas (revisto por Vissa & Brennan, 2002). Acredita-se que o bacilo em questão infectava nossos ancestrais hominídeos, co-evoluindo com nossa espécie desde seu surgimento (Monot *et al* 2005).

Embora o homem seja considerado como o único reservatório natural do bacilo, infecções experimentais em tatus (*Dasybus novencinctus*) realizadas na década de 60 mostraram que este animal é susceptível à infecção pelo *M. leprae*, consistindo em um reservatório acidental da doença nas américas (Kirchheimer & Storrs, 1971; Truman *et al* 2011). O interesse do uso de tatus na pesquisa biomédica sofreu um incremento quando foi observado que o tatu de nove bandas desenvolvia a forma disseminada da hanseníase, após a inoculação de bacilos derivados de lesões de pacientes com hanseníase virchoviana. A baixa temperatura corporal (30-35°C) característica da espécie, que seria uma exigência para a multiplicação do *M. leprae*, fez com que o tatu se tornasse um importante modelo experimental para estudo de diversos aspectos da hanseníase, além de ser utilizado para obtenção de bacilos em grandes quantidades (Madeira & Rosa, 2000).

Como dito anteriormente, o *M. leprae* não é cultivável em meios de cultura artificiais. Na busca por modelos experimentais da doença, em 1960, Shepard demonstrou a multiplicação do *M. leprae* em coxim plantar de camundongos da estirpe CFW, abrindo novas oportunidades para a investigação sobre os mecanismos imunológicos básicos de resistência do hospedeiro. A inoculação de 5×10^3 a 10^4 bacilos em um volume de 0,03 ml no coxim plantar traseiro de um camundongo normal alcança, após 120-240 dias, aproximadamente 10^6 bacilos/pata. O número total de bacilos permanece constante por cerca de um ano, quando entra na fase de declínio, porém, o número de bacilos viáveis diminui mais rapidamente, ou seja, logo depois do plateau (10^6 bacilos) ter sido alcançado. (Scollard, 2006).

Através da aplicação de uma suspensão bacilar em pele escarificada na região dorsal da pata do camundongo nude (linhagem de camundongos com mutação gênica desativando o gene *foxn1*, o que resulta em timo deteriorado ou ausente, ocasionando na inibição do sistema imune devido ao número reduzido de linfócitos T), Job e colaboradores (1990) obtiveram uma intensa infecção local com

disseminação para outras áreas. A supressão da resposta imune de camundongos por timentomia e irradiação, resulta no aumento da infecção nas patas e disseminação do bacilo para órgãos internos e tecidos periféricos, demonstrando que a habilidade de aumentar a infecção pela depleção da função das células T em um camundongo congenitamente atímico, proporciona um hospedeiro apropriado, sensível à infecção pelo *M. leprae*. Nesses camundongos atímicos, a multiplicação de *M. leprae* na pata parece ser disseminada alcançando 10^{10} ou mais bacilos. Assim, o desenvolvimento desse modelo de camundongo permite a realização de culturas com um grande número de bacilos altamente viáveis para uso experimental (Figura 1.4) (Katoch, 1999; Truman & Krahenbuhl, 2001; Lahiri, 2005). Atualmente o Brasil conta com uma planta de produção de bacilos em pata de camundongos nu/nu na instalações do Instituto Lauro de Souza Lima / Baurú, São Paulo.

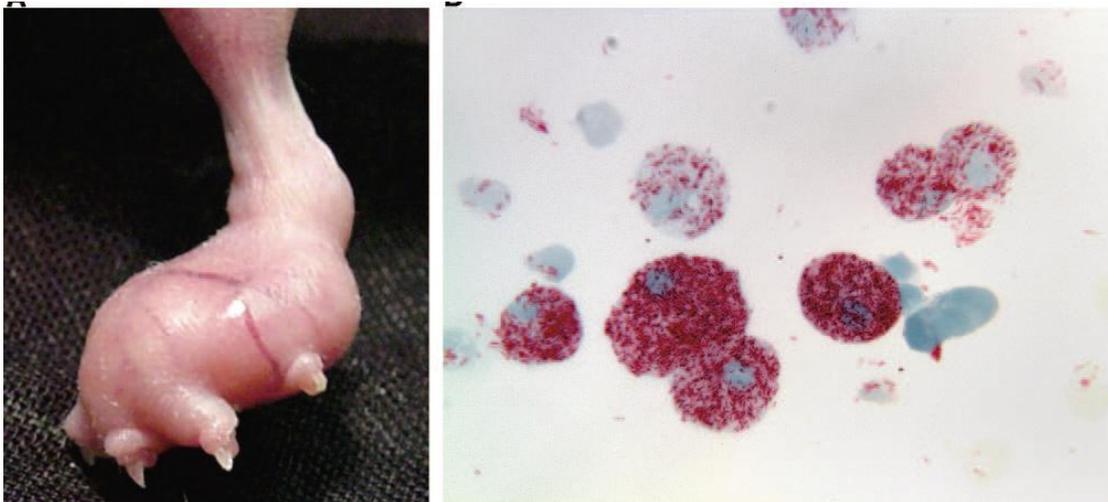


Figura 1.4. Cultivo de *M. leprae* em pata de camundongo. A) Pata edemaciada de camundongo nude 6 meses após infecção com 5×10^7 de *M. leprae*. **B)** Macrófagos altamente infectados provenientes da pata do camundongo (Scollard, 2006). Aumento x1000.

1.1.2 Características Gerais e Classificação

O comprometimento dos nervos periféricos é a característica principal da doença, dando-lhe um grande potencial para provocar incapacidades físicas que podem, inclusive, evoluir para deformidades. Estas incapacidades e deformidades acarretam problemas, tais como diminuição da capacidade de trabalho, limitação da vida social por discriminação e problemas psicológicos. São responsáveis também pelo estigma e preconceito associados à doença.

A hanseníase apresenta um longo período de incubação e as primeiras manifestações clínicas podem ocorrer entre dois e dez anos após a infecção (Jopling, 1983). Admite-se que as vias aéreas superiores constituem a principal porta de entrada e via de eliminação do bacilo (Araújo, 2003).

A manifestação da infecção na hanseníase caracteriza-se por ter um largo espectro. O desenvolvimento da doença pode se manifestar primeiramente como hanseníase indeterminada (HI), estágio inicial, em geral transitório, que pode evoluir para cura. Em caso de progressão, a resposta imune específica do hospedeiro frente ao bacilo irá definir os padrões da doença (Jopling 1991). Em um pólo estão os doentes que desenvolvem resposta protetora ao bacilo e um controle efetivo da disseminação da doença, não evoluindo, no entanto para cura espontânea (forma tuberculóide-TT), e no pólo oposto, aqueles que falham em responder aos antígenos do *M. leprae*, resultando na doença lepromatosa disseminada (forma virchowiana-LL). Entre esses pólos, há pacientes com quadros intermediários que refletem graduais variações da resistência ao bacilo que tendem a se aproximar das características de cada uma das formas polares: "borderline" tuberculóide (BT), "mid-borderline" (BB) e "borderline" virchowiano (BL) (Ridley & Jopling, 1966; Myrvang *et al*, 1973; Bloom & Godal, 1983) (Figura 1.5).

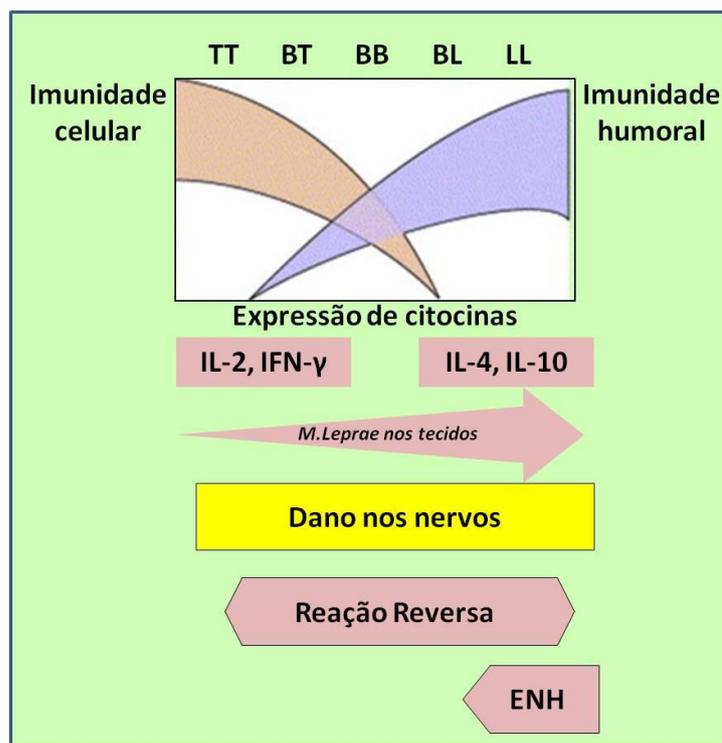


Figura 1.5: Classificação de Ridley-Jopling: TT: tuberculóide; BT: borderline tuberculóide; BB: borderline; BL: borderline lepromatoso; LL: lepromatoso; ENL: Eritema Nodoso Lepromatoso (Adaptado de Walker & Lockwood, 2007).

. Não existe até o momento diagnóstico sorológico ou molecular para Hanseníase, embora inúmeros trabalhos tentem indicar marcadores sorológicos e/ou moleculares de infecção, progressão da doença e eficácia do tratamento utilizando as mais diversas metodologias, como ELISA, técnicas de biologia molecular e ferramentas proteômicas (Gupta *et al* 2010, Spencer *et al*, 2012), porém esses achados ainda permanecem inconclusivos.

O diagnóstico realizado é baseado nas manifestações clínicas, como o aparecimento de manchas hipopigmentadas ou avermelhadas com alterações na sensibilidade, pesquisa de bacilos em esfregaço de linfa (baciloscopia) e exame histopatológico das lesões cutâneas.

A maneira mais eficaz de prevenir as complicações decorrentes da hanseníase se dá através do diagnóstico e tratamento precoce dos casos, antes de ocorrerem lesões nervosas e disseminação da doença para os contatos do caso índice.

1.1.4 Episódios Reacionais

A evolução crônica e insidiosa da doença pode ser sobreposta por fenômenos inflamatórios agudos, as reações hansênicas. Os episódios reacionais podem ocorrer em qualquer uma das formas clínicas, sendo rara sua detecção na hanseníase indeterminada. Os estados reacionais são a principal causa de lesões dos nervos e de incapacidades provocadas pela hanseníase. Portanto, é importante que o diagnóstico dos mesmos seja feito precocemente, para se dar início imediato ao tratamento, visando prevenir essas incapacidades.

Os surtos reacionais representam episódios inflamatórios que se intercalam no curso crônico da hanseníase, ocorrendo antes ou ao longo do tratamento, podendo ocorrer também depois do mesmo, nesse caso após a cura do paciente. Quando ocorrem antes do tratamento, podem induzir ao diagnóstico da doença.

Os tipos de reação mais importantes são a reação reversa (RR) ou reação do tipo I e a reação do tipo II ou eritema nodoso da hanseníase (ENH). A reação do tipo I tende a surgir mais precocemente no tratamento, entre o 2º e o 6º meses. Observa-se a reação do tipo II ou ENH nas formas virchowianas, em geral após seis meses de tratamento.

Clinicamente, a reação reversa se manifesta por um aumento do processo inflamatório nas lesões de pele, nervo ou ambas, bem como pelo aparecimento de novas lesões (Jih *et al* 2002). Edema nas mãos, pés e face também podem ser uma característica da reação, mas sintomas sistêmicos, como febre, são incomuns. O aumento do processo inflamatório nos nervos compromete a função nervosa, e se não for tratada rápida e adequadamente leva a perda permanente dessa função causando neuropatia periférica sensorial e motora. A reação reversa é frequentemente recorrente, e isso pode conduzir a um maior dano nervoso (Van Brakel *et al* 1994).

O eritema nodoso hansênico (ENH), ou reação tipo II, é uma complicação imunológica da hanseníase que acomete cerca de 50% dos pacientes lepromatosos e 10% dos pacientes borderline lepromatosos (Pocaterra *et al* 2006). O risco de se desenvolver o ENH é maior quanto maior for o índice bacteriano (IB) e o infiltrado inflamatório presente na lesão (Manandhar *et al* 1999). As lesões cutâneas podem apresentar-se como eritematosas, pápulas ou nódulos que podem ser superficiais ou profundos. Clinicamente, o ENH é caracterizado por sintomas sistêmicos, como febre alta, mal estar, edema da face, mãos e pés.

A patogênese da reação tipo II é relacionada também com a deposição de complexos imunes nas lesões e aumento na expressão de TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , proteína C reativa, proteína amiloide A e α -1-antitripsina, (Moraes *et al* 2001; Kahawita & Lockwood,2008; Lee *et al*, 2010).

A ocorrência dos episódios reacionais é considerada uma emergência clínica e o tratamento anti-inflamatório precisa ser prontamente iniciado. Pacientes com RR são tratados com esteroides (Prednisona a 1,0 mg/kg), enquanto pacientes ENL são tratados preferencialmente com Talidomida (300 mg/dia) ou Pentoxifilina (400 mg de 8 em 8 horas), associada ou não a esteroides (Ustianowsky *et al*, 2003; Foss *et al*, 2005). Nesse contexto, há um especial interesse voltado para determinar marcadores clínicos ou laboratoriais que identifiquem pacientes com potencial risco para o desenvolvimento das reações.

1.1.5 Tratamento

O tratamento específico da hanseníase indicado pelo ministério da saúde é eminentemente ambulatorial. Nos serviços básicos de saúde, administra-se uma associação de medicamentos, a poliquimioterapia padronizada pela Organização mundial da saúde (PQT/OMS). A PQT/OMS mata o bacilo e modula o sistema imune do paciente, evitando assim a evolução da doença, prevenindo as incapacidades e deformidades por ela causadas, levando à cura ao longo de 12 meses de tratamento. O bacilo morto é incapaz de infectar outras pessoas, rompendo a cadeia epidemiológica da doença. Assim sendo, logo no início do tratamento a transmissão da doença é interrompida e, se realizado de forma completa e correta, garante a cura da doença.

A dapsona foi o primeiro antibiótico efetivo contra o *M. leprae*. Porém devido às expressivas notificações de resistência do bacilo, em 1982, a Organização Mundial de Saúde implantou o tratamento com a Poliquimioterapia, que consiste na administração de um conjunto de drogas: clofazimina (300 mg, uma dose por mês e 50 mg por dia, dapsona (100 mg por dia) e rifampicina (600 mg, uma dose por mês) para os pacientes multibacilares durante um ano e rifampicina e dapsona para os paucibacilares por um período de seis meses.

Dentre os efeitos colaterais da rifampicina relatados pelo ministério da saúde, estão trombocitopenia e sangramentos. Quanto à clofazimina, há relato de prolongamento do tempo de tromboplastina parcialmente ativada e no tempo de protrombina (Paina *et al*, 2008), não sendo, porém, relatado nenhum evento de trombose em decorrência do uso da PQT.

A informação sobre a classificação do doente é fundamental para se selecionar o esquema de tratamento adequado ao seu caso. Para crianças com hanseníase, a dose dos medicamentos do esquema padrão é ajustada de acordo com a idade e peso. Já no caso de pessoas com intolerância a um dos medicamentos do esquema padrão, são indicados esquemas alternativos. A alta por cura é dada após a administração do número de doses preconizado pelo esquema terapêutico, dentro do prazo recomendado.

1.2 Hemostasia e Coagulação

O sangue é um tecido conjuntivo líquido complexo no qual estão suspensos diversos tipos celulares, constituindo-se o principal sistema de transporte do corpo. A alteração do equilíbrio entre os fatores vasculares e sanguíneos pode levar a um extravasamento sanguíneo ou a uma alteração no estado de fluidez, dificultando ou impedindo a circulação no local de sua formação devido a uma massa sólida denominada trombo.

Os componentes do sistema hemostático incluem as plaquetas, os vasos, as proteínas da coagulação do sangue, os anticoagulantes naturais e o sistema de fibrinólise. O equilíbrio funcional entre esses diferentes componentes da hemostasia é garantido por uma variedade de mecanismos, envolvendo interações entre proteínas, respostas celulares complexas, e regulação de fluxo sanguíneo.

A coagulação é uma função conservada entre diversos grupos de seres vivos, desde insetos, nos quais tem a função de combate aos invasores, aos seres humanos, com a função principal de evitar o extravasamento do sangue.

A iniciação do processo de coagulação depende da exposição do sangue a componentes que, normalmente, não estão presentes no interior dos vasos, em decorrência de lesões estruturais (injúria vascular) ou alterações bioquímicas (por ex., indução da expressão de fator tissular no endotélio).

A formação do coágulo de fibrina envolve complexas interações entre proteases plasmáticas e seus cofatores, que culminam na gênese da enzima trombina, que, por proteólise, converte o fibrinogênio solúvel em fibrina insolúvel.

A hipótese da “cascata” para explicar a fisiologia da coagulação do sangue foi proposta em 1964 por Macfarlane e Davie & Ratnoff. Nesse modelo a coagulação ocorre por meio de ativação proteolítica seqüencial de zimogênios, por proteases do plasma (Figura 1.6).

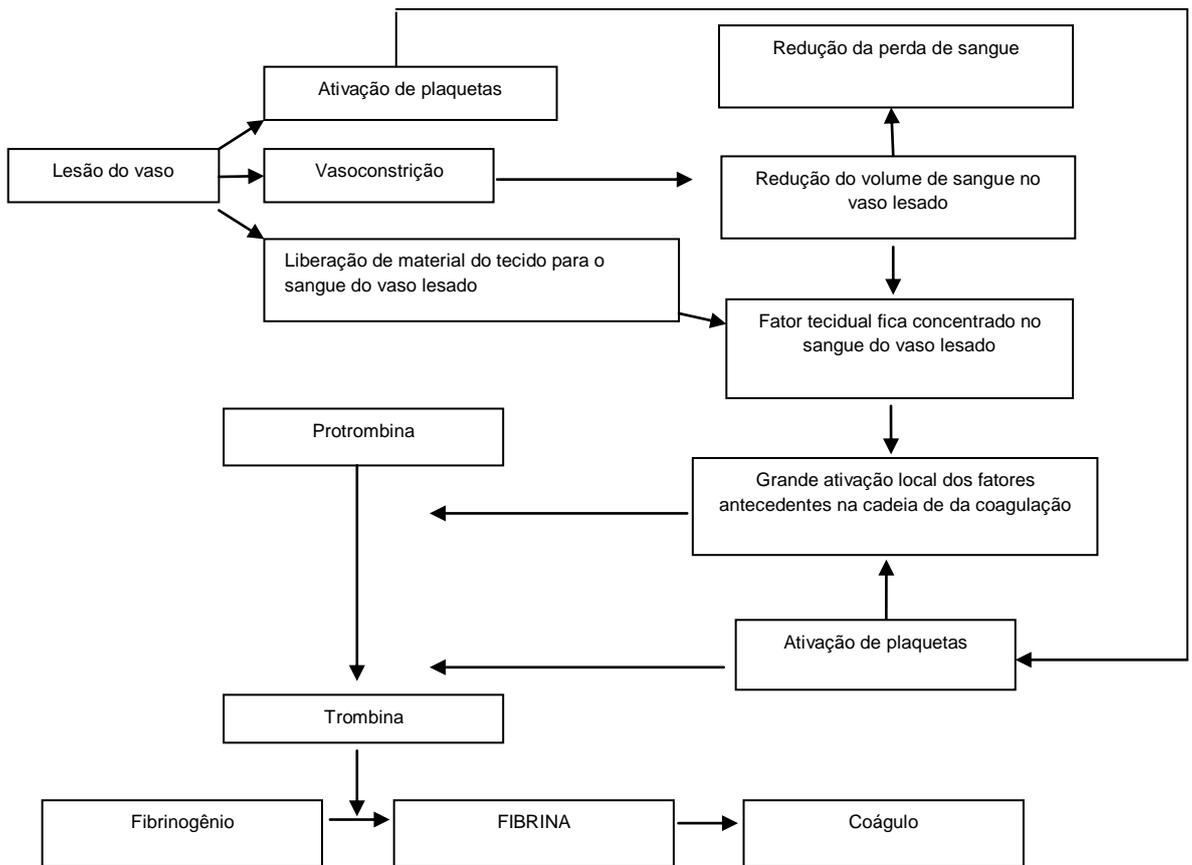


Figura 1.6: Mecanismos de formação do coágulo de fibrina. Adaptado de Terra, 2004

O esquema clássico divide a coagulação em uma **via extrínseca**, correspondendo ao conjunto de fatores cuja cadeia de ativações, para se iniciar, depende do fornecimento de material proveniente do tecido, e uma **via intrínseca**, correspondendo ao conjunto de fatores cuja cadeia de ativações se inicia por simples contato com certos tipos de superfície, que convergem para o ponto de ativação do fator X (“via final comum”).

Na via extrínseca, o fator VII plasmático, na presença do seu cofator, o fator tecidual (ou tromboplastina) ativa diretamente o fator X. Na via intrínseca, ativação do fator XII ocorre quando o sangue entra em contato com uma superfície, contendo cargas elétricas negativas (por exemplo, a parede de um tubo de vidro). Tal processo é denominado “ativação por contato” e requer ainda a presença de outros componentes do plasma: pré-caliceína (uma serinoprotease) e cininogênio de alto peso molecular (um cofator não enzimático). O fator XIIa ativa o fator XI, que, por sua vez, ativa o fator IX. O fator IXa, na presença de fator VIII, ativa o fator X da coagulação, desencadeando a geração de trombina e subsequente formação de fibrina.

Atualmente, novos conceitos para entender os eventos da coagulação têm surgido. Embora o conceito da "cascata" da coagulação tenha representado um modelo bem sucedido e um avanço significativo no entendimento da coagulação, observações experimentais e clínicas mais recentes demonstram que a hipótese da cascata não reflete completamente os eventos da hemostasia *in vivo* (Robert *et al* 2006).

Recentemente foi proposto o modelo baseado em superfícies celulares, no qual a hemostasia requer substâncias procoagulantes ativadas que permaneçam localizadas no sítio da lesão para a formação de tampão plaquetário e de fibrina neste local. Neste novo modelo, o processo de coagulação sanguínea é iniciado pela exposição de Fator tecidual (FT) na corrente sanguínea. O FT não é expresso constitutivamente nas células endoteliais, mas está presente nas membranas das células ao redor do leito vascular, como células do músculo liso e fibroblastos. Dessa forma, o FT é exposto na circulação sanguínea pela lesão endotelial e de células vizinhas ou pela ativação de células endoteliais ou monócitos (Riddel *et al* 2007; Lefkowitz, 2008).

Este modelo propõe a ativação do processo de coagulação em quatro fases que se sobrepõem: iniciação, amplificação, propagação e finalização, que estão sumarizadas na Tabela 1.1.

Tabela 1.1: Fases do processo hemostático (adaptado de Riddel *et al* 2007)

Iniciação	Amplificação	Propagação	Finalização
Após injúria vascular e perturbação na circulação das células sanguíneas, ocorre a interação do FVIIa presente no plasma com o fator tecidual. Há pouca produção de fibrina.	A trombina inicia a ativação de plaquetas e cofatores (FVa e FVIIIa) e FXI nas superfícies plaquetárias.	Há produção significativa e consequente aumento na atividade da trombina, geração do tampão estável no local da lesão tecidual e interrupção do sangramento.	Ocorre a limitação do processo de coagulação para se evitar a oclusão trombótica em áreas normais do vaso ao redor da lesão.

A fibrinólise consiste em um mecanismo de reparo nos depósitos de fibrina nos vasos sanguíneos, de pessoas saudáveis e doentes. A fragmentação da fibrina resulta da ação proteolítica da plasmina que existe no organismo sob a forma de um precursor inativo, o plasminogênio. Por ação de ativadores endógenos ou exógenos ocorre alteração na estrutura molecular do plasminogênio que se converte em plasmina. Os mecanismos para a formação e dissolução da fibrina são semelhantes, sendo a concentração de fibrina resultante do equilíbrio entre sua formação e degradação. O conceito de perturbação de coagulação como mecanismo intermediário de doença, é um dos assuntos de maior atualidade em medicina (Langer e Wolosker, 2006). Multiplicaram-se as publicações de pesquisas clínicas e experimentais e admite-se atualmente que uma tendência à coagulação sanguínea, definida como estado de hipercoagulabilidade e ainda não detectada laboratorialmente, pode determinar várias perturbações clínicas.

1.3 Inflamação x Coagulação

A primeira defesa do organismo a um dano tecidual é a resposta inflamatória. A inflamação é um processo biológico complexo que envolve componentes vasculares, celulares e uma diversidade de substâncias solúveis, apresentando como sinais clínicos característicos rubor, calor, edema, dor e prejuízo funcional. Durante a inflamação vários sistemas bioquímicos, como o sistema do complemento e da coagulação, são ativados auxiliando no estabelecimento, evolução e resolução do processo.

O sangue contém níveis de fatores de coagulação 100 vezes superiores ao necessário para coagular todo fibrinogênio plasmático. No entanto, os indivíduos

saudáveis têm um potente mecanismo de proteção que impede o excesso de geração de trombina. Conceitualmente, todo o sistema trabalha de modo a permitir a formação rápida do coágulo de fibrina (Esmon, 2004). Assim, quando a coagulação é comprometida, ela pode contribuir para a patogênese de várias condições inflamatórias através da deposição de fibrina no interior dos vasos, bem como através do aumento da resposta inflamatória. A contribuição do fibrinogênio e/ou fibrina para a inflamação tem sido reconhecida, enquanto o papel dos produtos de degradação da fibrina neste processo permanece desconhecido (Jennewein, 2011).

Já é conhecido que doenças autoimunes como a Síndrome do Anticorpo Antifosfolípideo (Sène *et al*, 2008), a sepse (Salluh *et al*, 2011) e infecções por patógenos como o vírus HIV (Dikshit *et al*, 2009), protozoários (Francischetti *et al*, 2008) e bactérias (Martinuzzo, 2002) estão associadas com profundas alterações no balanço hemostático sistêmico, incluindo ativação da coagulação e supressão da fibrinólise. A relação entre coagulação e inflamação tem sido observada através de estudos da resposta fisiológica do organismo frente a diversos tipos de estímulos pró-inflamatórios capazes de ativar pelo contato a cascata da coagulação e as células fagocitárias.

A inflamação como resposta a uma infecção grave resulta em ativação local e sistêmica da coagulação. Tais eventos inicialmente foram descritos como resultado da ação direta de endotoxina ou de microrganismos. Contudo, a partir da década de 90, avanços no conhecimento da sepse e da resposta inflamatória sistêmica permitiram o reconhecimento de que o principal precursor da geração de trombina relacionada com a inflamação é o fator tecidual (Van der Pol *et al*, 2011).

O fator tecidual é uma proteína transmembrana constitutivamente expressa no organismo encontrando-se de modo predominante nos tecidos subcutâneos. O FT também é expresso em células mononucleares ativadas por citocinas que tem papel preponderante na resposta do hospedeiro às infecções (Van der Pol *et al*, 2011).

Nesse contexto, as células endoteliais desempenham um importante papel na indução/regulação do processo de coagulação mediado por mecanismos inflamatórios (Figura 1.7), uma vez que são também alvos para as reações imunes locais e sistêmicas do organismo; estando envolvidas na adesão de neutrófilos e de monócitos, na indução da síntese do fator de ativação plaquetária (PAF) e fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Bevilacqua *et al* 1987; Cotran, 1987;McMillen, 1993).

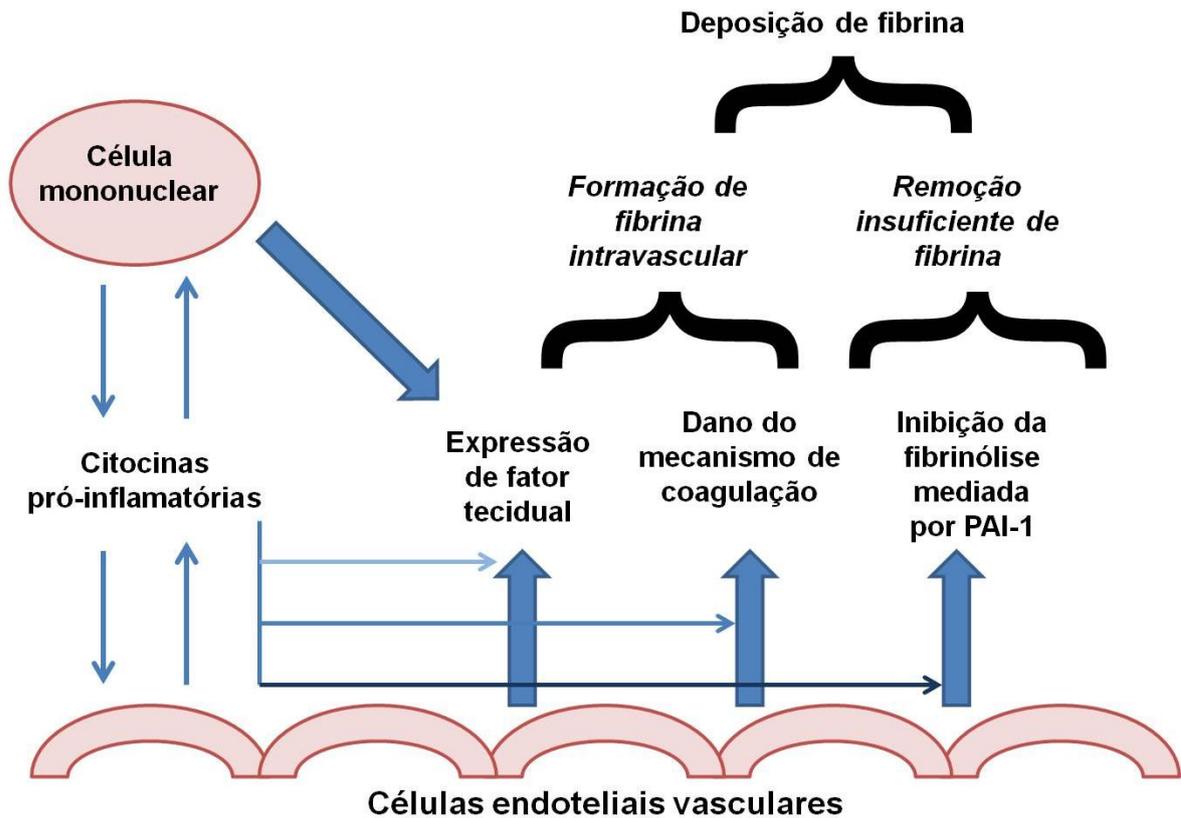


Figura 1.7: Representação esquemática de vias moleculares na coagulação intravascular disseminada (CID). Durante a resposta inflamatória sistêmica, tanto células endoteliais como células mononucleares ativadas podem produzir citocinas pró-inflamatórias que medeiam a ativação da coagulação. A ativação da coagulação é iniciada com a expressão do fator tecidual em células mononucleares e células endoteliais ativadas. Além disso, a regulação negativa de mecanismos anticoagulantes fisiológicos e inibição da fibrinólise por células endoteliais vai promover ainda mais a deposição de fibrina intravascular. PAI-1 indica ativador do plasminogênio tipo 1. (Adaptado de Levi, 2003).

As células endoteliais constituem em uma barreira importante entre o sangue e o espaço extracelular. Também são de crucial importância para a hemostasia, mantendo equilíbrio entre a coagulação e a anticoagulação, devido a uma série de fatores tais como a capacidade para produzir moléculas semelhantes à heparina, trombomodulina, proteína C, prostaciclina, moléculas de adesão e fatores de crescimento que podem não só promover a resposta inflamatória, como também afetar a coagulação (Levi *et al*, 2003).

A inflamação é um mecanismo de defesa, mas pode ela própria ser uma doença ou às vezes ter efeitos clínicos indesejáveis. Doenças autoimunes como artrite reumatóide e reações de hipersensibilidade são alterações com base nos fenômenos inflamatórios.

A resposta inflamatória, como resultado de infecção de tecidos, requer a migração de leucócitos a partir do sistema vascular para a área infectada como parte da imunidade de inata e adaptativa. Após o extravasamento no compartimento subendotelial, os leucócitos encontram a matriz extracelular (MEC), que tem sido descrita como um ambiente de total importância para a modulação do comportamento celular, atuando na adesão e migração celular ou na liberação de fatores de crescimento, tendo o seu papel em doenças infecciosas como a hanseníase (Antunes *et al*, 1999) e a tuberculose (Elkington *et al*, 2011) frequentemente estudado.

A degradação da MEC por enzimas denominadas metaloproteinases de matriz (MMP) pode amplificar a inflamação, já que a clivagem das proteínas da MEC pode gerar fragmentos quimiotáticos, que contribuem para o recrutamento de células inflamatórias (Hunninghake, 1981), além de ativar a coagulação pela via de contato.

Metaloproteinases de matriz (MMP) formam uma família de endopeptidases que coletivamente são capazes de degradar a maioria dos componentes da MEC e membrana basal, não estando envolvidas somente no remodelamento da matriz, mas também na participação da progressão de processos inflamatórios e proliferação celular (Ito *et al*, 1996; Whitelock *et al*, 1996; Korpos *et al*, 2009; Imai *et al*, 1997).

As metaloproteinases de matriz são muito importantes durante a infecção bacteriana pela ação direta nos componentes da matriz extracelular. Teles e colaboradores (2010) observaram um aumento nos níveis de mRNA de MMP-9 e MMP-2 e das proteínas correspondentes, conjuntamente com o aumento dos níveis de expressão de TNF- α e IFN- γ nas lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide e em reação, também sendo correlacionada com destruição generalizada do tecido em pacientes com tuberculose.

Paralelamente, temos a participação de anticorpos antifosfolipídeos no processo de coagulação. Anticorpos Antifosfolipídeos (AAF) constituem um grupo heterogêneo de anticorpos, os quais têm sido reportados na definição de doenças autoimunes e também durante doenças infecciosas (Sène, 2008). Os alvos-chave destes anticorpos são fosfolipídeos e cofatores fosfolipídicos da cascata da coagulação e das membranas celulares. As superfícies plaquetária e endotelial são alvos conhecidos de AAF, porém os mecanismos pelos quais anticorpos circulantes reagem contra fosfolipídeos intracelulares permanecem incertos (Love & Santoro, 1990; Louzada *et al*, 1998).

A presença de AAFs no plasma caracteriza uma síndrome denominada Síndrome do Anticorpo Antifosfolípideo (SAA), que é uma desordem autoimune de hipercoagulabilidade adquirida, cujos portadores apresentam quadros de trombose vascular e recorrentes complicações gestacionais. Esse estado pro-trombótico também tem sido relacionado com a indução de um fenótipo pro-inflamatório (Tanne *et al*, 2008).

A maioria dos componentes do sistema de coagulação parece estar envolvida na patogenicidade dos anticorpos antifosfolípeos, incluindo a cascata da coagulação, assim como a ativação e agregação plaquetária. A interferência em qualquer um desses elementos pode ser um possível mecanismo de alteração hemostática (Louzada *et al*, 1998).

1.4 Coagulação e doenças micobacterianas

Alguns autores já apontaram para a presença de distúrbios em etapas da cascata da coagulação sanguínea na hanseníase, como adesividade plaquetária e fibrinólise (Parvez *et al*, 1979; Martinuzzo *et al*, 2002), porém esses achados ainda são inconclusivos

A propósito de alterações da coagulação sanguínea, na vigência de ENH, Freitas e Fleury (1998), em um trabalho sobre o perfil hematológico dos pacientes com ENH observou aumento do tempo de lise da euglobulina (exame que avalia a fibrinólise) em casos de ENH. Este achado laboratorial reflete uma diminuição na fibrinólise, talvez ligada ao aumento dos níveis de fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina – 1(IL-1) nestas reações. Associada a fibrinólise deficiente temos nos casos mais intensos de ENH, reação inflamatória aguda com lesões generalizadas nos vasos da circulação terminal. Estas lesões podem ativar a coagulação pelas vias intrínsecas e extrínsecas, ou seja, exposição do colágeno subendotelial como fator de contato.

Diversos autores tem relatado a prevalência de anticorpos antifosfolípeos na hanseníase. Embora eventos tromboembólicos não sejam frequentes nesta doença, (Gupta *et al*, 1975), diversos trabalhos já demonstraram haver distúrbios na cascata de coagulação de pacientes hansenícos ocasionados por anticorpos antifosfolípeos (aPL) (Elbeyali *et al*, 2000; Martinuzzo *et al*, 2002). Segundo Sène

(2008), dentre as infecções bacterianas, a hanseníase é provavelmente a doença cuja associação com anticorpos anticardiolipina é mais bem explorada. Autoanticorpos têm sido relatados predominantemente no polo multibacilar da hanseníase, que apresenta marcada resposta imunológica humoral. Entretanto, a origem dos autoanticorpos na hanseníase e em outras doenças infecciosas crônicas ainda não é bem estabelecida, podendo ser devida à ativação policlonal das células B por componentes da bactéria, presença de reação cruzada entre antígenos bacterianos e autoantígenos, ou, à lesão tecidual crônica e exposição de antígenos habitualmente ocultos (Chavez-Legaspi et al 1985; Bonfá et al 1987; Miller et al 1987; Medina et al 1998).

Uma variação da reação tipo II da hanseníase, um fenômeno denominado fenômeno de Lúcio, cuja apresentação clínica é caracterizada como um eritema necrosante tem sido associado frequentemente a alterações vasculares com a presença de BAAR na derme ou em torno dos vasos sanguíneos, invadindo a parede vascular e as células endoteliais, ocasionando a diminuição do lúmen vascular por proliferação dos bacilos ou a total oclusão do vaso por trombos (Figura 1.8), acarretando o extravazamento dos glóbulos vermelhos para o tecido, assim como infiltrado inflamatório rico em neutrófilos e linfócitos (Vargas, 2007). Nas lesões do Eritema Necrosante há extensa agressão do território vascular terminal e necroses teciduais, da mesma maneira ou talvez com maior intensidade do ocorrido em casos de ENH, onde pode-se observar eventualmente severas alterações da coagulação sanguínea (Fleury, 1998).

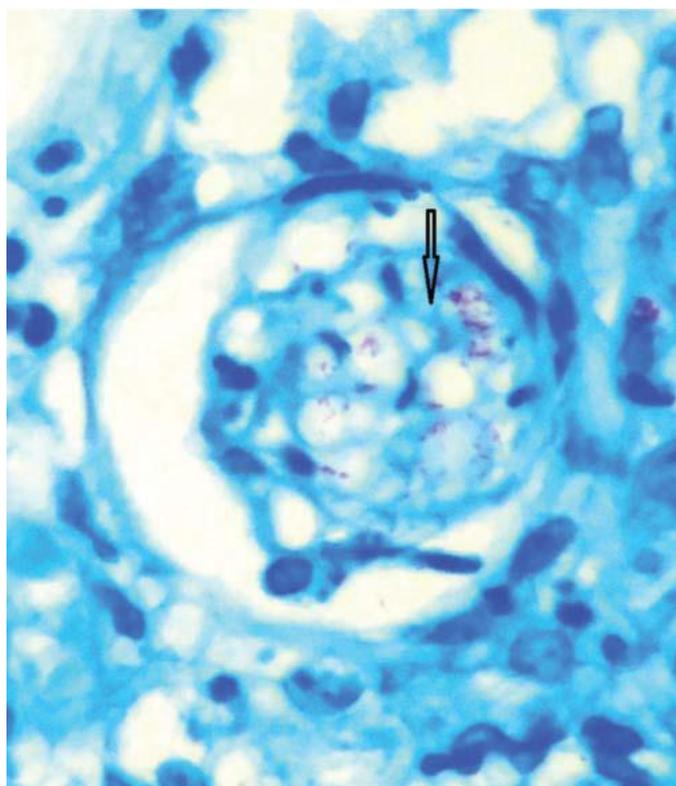


FIGURA 1.8: Imagem de microscopia ótica onde seta aponta trombo em vaso sanguíneo, contendo numerosos bacilos de Hansen. (Monteiro et al 2012)

Diversos estudos relataram a ocorrência de complicações trombóticas, em particular, na coagulação intravascular disseminada (DIC) e trombose venosa profunda (TVP), em pacientes de tuberculose (Fujita et al 1997, Mark et al 2007). Kothari e colaboradores (2012) demonstraram o aumento da expressão de fator tecidual em macrófagos infectados pela cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, o que segundo os autores poderia servir como uma plataforma para o aumento da formação de trombos com consequências como DIC e TVP.

Outros autores relataram uma diminuição dos níveis de antitrombina III (AT-III) e plaquetas simultaneamente com hiperfibrinogenemia, incluindo níveis elevados de seus produtos de degradação, de ativador do plasminogênio tecidual e fator ativador de plaquetas (PAF-1) (Shitri et al 2004), sendo a explicação mais aceita para estes achados, a ativação da via de coagulação pela inflamação aguda.

1.4.1 Justificativa

Estudos anteriores apresentam divergências quanto à presença de distúrbios trombogênicos na hanseníase. Na clínica da Hanseníase é observada a formação de uma massa sólida esbranquiçada na obtenção de soro de alguns pacientes. Clínicos em todo o Brasil se referem a essa massa como precipitado lipídico ou gorduroso. O fenômeno é frequentemente observado no soro de pacientes hansenícos, majoritariamente naqueles que apresentavam alta bacteremia (Figura 1.9).

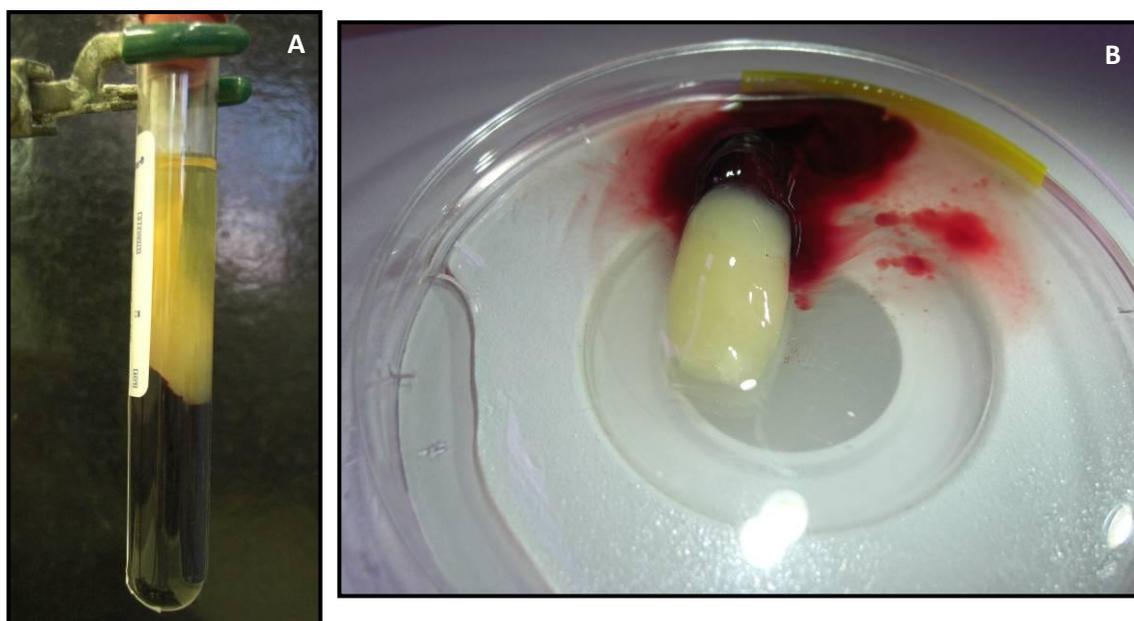


Figura 1.9: Aparência da “massa lipídica” observada durante a coleta de soro de pacientes de hanseníase. A) Tubo de ensaio contendo sangue colhido de paciente de Hanseníase virgem de tratamento, o agregado associado ao coágulo pode ser observado não no topo do tubo (como no caso de quilomicrons), mas sobre os eritrócitos. B) Agregado retirado do tubo com o uso de pinça, apresentando aspecto sólido.

Esses fatos que sugerem o aumento da atividade trombogênica na hanseníase despertaram-nos o interesse na realização deste trabalho. Acreditamos que um melhor entendimento das bases moleculares na formação deste tipo coágulo pode auxiliar na compreensão da fisiopatologia da hanseníase e provavelmente contribuir com novos candidatos moleculares para o diagnóstico sorológico da doença.

Decifrar a natureza da “massa lipídica” observada durante a coleta do soro do pacientes de Hanseníase, avaliando parâmetros da coagulação em pacientes do polo Multibacilar da hanseníase, estando estes em reação ou não.

2.1 Objetivos específicos:

- Realizar a análise proteômica da “massa lipídica”.
- Realizar a análise proteômica comparativa entre a “massa lipídica” e um coágulo formado em plasma de indivíduo sadio.
- Verificar os níveis de fibrinogênio, dímero-D, Anticorpos anti-cardiolipina e lipídeos no sangue de pacientes dos diferentes polos da hanseníase.
- Verificar alterações nos tempos de tromboplastina parcial ativada (aPTT) e de Protrombina (PT) no plasma de pacientes de hanseníase.
- Analisar por ELISA os níveis séricos de MMP-9 e Fator de von Willebrand nos pacientes que apresentaram o coágulo hansênico, no momento deste evento e em outros períodos do tratamento (antes ou depois).
- Avaliar os níveis de Fator Tecidual no soro e em fragmentos de pele obtidos por biopsia de pacientes de hanseníase.
- Analisar por histoquímica a presença de glicosaminoglicanos em fragmentos de pele obtidos por biópsias de pacientes hansenianos.

3.1 Seleção e classificação dos pacientes

Neste trabalho foram estudados pacientes portadores de hanseníase, pertencentes a duas coortes diferentes, tratados no centro de referência Ambulatório Souza Araújo da FIOCRUZ/RJ. Todas as amostras de soro colhidas de pacientes de hanseníase, no período de 2009 a 2013 que apresentaram o coágulo após a centrifugação foram inseridas neste projeto.

Na primeira coorte, o soro de 35 pacientes foi obtido por punção venosa de aproximadamente 20 mL de sangue, coletado sem anticoagulante em um tubo Vacutainer (BD Diagnostics). Para obtenção do soro, o sangue permaneceu 10 minutos à temperatura ambiente para a formação do coágulo, sendo em seguida centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. A massa em estudo surgia no limiar entre o coágulo de eritrócitos e o soro, sendo então separada, lavada com salina tamponada com fosfato (PBS) e congelada a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior separação de seus constituintes e análise por eletroforese. O soro destes pacientes também foi aliqotado e congelado para análises futuras.

Para fins de comparação, induzimos a formação de coágulo pela adição de cloreto de cálcio (0,5 M) em plasma obtido de indivíduos saudáveis (N=3). O coágulo foi fotografado, pesado e congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para posterior análise (figura 3.1).

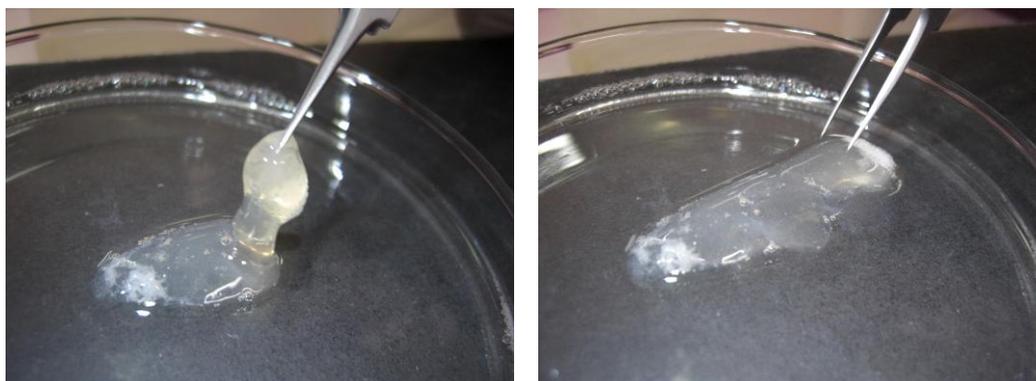


Figura 3.1: Coágulo gerado em plasma de indivíduos saudáveis. É possível observar que ao contrário do coágulo formado espontaneamente pelos pacientes do polo lepromatoso (multibacilares) o coágulo formado através da adição de cálcio em plasma de indivíduos normais não apresenta a mesma rigidez e coloração esbranquiçada, tendendo mais ao incolor.

Esta primeira coorte é formada por 24 homens e 11 mulheres, com idade variando de 10-71 anos, com média etária de 48 anos. Dos pacientes que apresentaram o coágulo, 31 eram multibacilares (formas clínicas LL, BL ou BB) e 4 eram paucibacilares (forma clínica BT). Um total de 16 pacientes estavam em reação, sendo 12 em reação tipo II e 4 em reação tipo I. Dos 35 pacientes, 9 eram virgens de tratamento, sendo 4 não reacionais, 2 estavam em reação tipo II e 3 em reação reversa. Quanto às doenças pré-existentes quando da entrada no atendimento no Ambulatório Souza Araújo, 24 pacientes relataram algum tipo de doença respiratória, enquanto que 5 relataram hipertensão arterial, 2 relataram reumatismo e 1 relatou diabetes.

Para os estudos de coagulação, foram utilizadas amostras de sangue de 24 pacientes (segunda coorte). Todos os pacientes eram multibacilares em reação tipo II (n=14) ou não reacionais (n=10) sendo 6 mulheres e 18 homens, com idade média de 45 anos, virgens de tratamento, também recrutados junto ao Ambulatório Souza Araújo.

Para a análise histoquímica e imunofluorescência, foram utilizadas lâminas de fragmentos de pele obtidos por biopsia de pacientes multibacilares não reacionais ou em reação tipo II, após o diagnóstico do paciente.

Cada paciente foi avaliado através de exame clínico e dermatológico, do índice bacteriológico (IB), sendo categorizados de acordo com a classificação de Ridley e Jopling (1963), e receberam a poliquimioterapia recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) após a coleta da amostra. Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram examinados quanto aos sintomas clínicos da hanseníase. Este projeto está amparado pelo comitê de ética CEP/Fiocruz 509/09 de 15.06.2009. Para a proteção e bem estar dos indivíduos incluídos neste estudo, não foi divulgado o nome de nenhum dos participantes.

3.2 Obtenção de extrato proteico, determinação da concentração de proteínas e SDS-PAGE

Para a realização dos experimentos de proteoma, as “massas lipídicas” recolhidas dos soros dos pacientes e os coágulos controle foram macerados em solução de extração (Uréia 7 M, Tiouréia 2 M, CHAPS 4%, Tris 40 mM e DTT 60 mM), seguido de cinco ciclos de *freeze-taw*.

A concentração proteica das amostras foi determinada utilizando-se o 2-D Quant-Kit (Amersham Biosciences) segundo as especificações do fabricante. O procedimento é baseado na precipitação de proteínas através da ligação específica de íons de cobre com as mesmas. O cobre não ligado é medido por ensaio colorimétrico, sendo a densidade da cor inversamente relacionada com a concentração de proteínas. Linearidade da reação: 0-50 µg de proteína.

Para a eletroforese unidimensional (SDS-PAGE), 30 µg de extrato proteico das “massas lipídicas” e coágulos controle foram misturados em tampão de amostra (1,25 mL de Tris 0,5 M pH 6,8; 4 mL de Glicerol; 0,2 g de SDS; 0,5 mL de β-Mercaptoetanol, 0,25 mL de Azul de Bromofenol 0,05 %, água deionizada q.s.p.). A mistura foi em seguida aquecida a 100 °C por 5 minutos. Posteriormente as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % (gel concentrador de 4%) em condições desnaturantes. As condições elétricas empregadas foram 10 mA/gel por 30 min e 20 mA/gel até o fim da corrida.

3.3 Eletroforese bidimensional

3.3.1 Focalização Isoelétrica (1ª dimensão)

Para a eletroforese bidimensional (Görg *et al.*, 2004), 500 µg de extrato proteico foram submetidos à focalização isoeletrica, utilizando-se fitas de focalização de 24 cm, com intervalo linear de pH entre 4 e 7 (Biorad). As amostras foram solubilizadas em solução de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 4 % (m/v), azul de bromofenol 0,002 % (m/v), DTT 60 mM e IPG *buffer* 1 % pH 4-7 (v/v) e aplicadas nas fitas de IPG. A reidratação das fitas foi feita a 20 °C, por 12 horas, a 30 volts. As condições elétricas (da primeira dimensão no sistema Ettan IPGphor (GE Healthcare) foram: 200 volts por 1 hora, 500 volts por 1 hora, 1.000 volts por 1 hora, 1.000-3.500 volts por 30 min e 3.500 volts por 4 horas.

3.3.2 Eletroforese em SDS-PAGE (2ª dimensão)

Após a focalização isoeétrica, as fitas foram incubadas por 15 minutos, sob agitação, em 10 mL de solução de equilíbrio (Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, ureia 6 M, glicerol 30 % (v/v), SDS 2 % (m/v) e azul de bromofenol 0,002 % (m/v) contendo 100 mg de DTT, para a redução das pontes dissulfeto. Em seguida a solução de equilíbrio foi descartada, seguindo-se nova incubação com solução de equilíbrio, desta vez contendo 400 mg de iodoacetamida, para alquilação dos grupos sulfidríla. Em seguida as fitas foram posicionadas sobre gel de poliacrilamida 12 % com SDS (Laemmli, 1970). O sistema foi selado com agarose a 80 °C, preparada a 0,5 % (m/v) em tampão de corrida Tris-glicina (Tris-base 24,6 mM, Glicina 192 mM, SDS 0,5%). As condições elétricas empregadas foram 5 mA/gel por 30 minutos e 10 mA/gel constantes até o final da corrida

3.3.3 Coloração dos géis e análise das Imagens

Os géis foram corados por Comassie G-250 coloidal para visualização dos spots a serem analisados por espectrometria de massas. A análise diferencial entre os géis do coágulo hansênico e do coágulo controle foi feita através do software PDQuest (BioRad). Em nossas análises, foi utilizado o método de normalização denominado *Total density in Gel Image*, onde o valor de intensidade de pixel de cada spot, medido em partes por milhão (ppm), é dividido pelo valor de intensidade total de todos os pixels presentes na imagem. Este modelo de normalização assume que a densidade total de uma imagem (incluindo a densidade do background e densidade do spot) será relativamente consistente de gel para gel, favorecendo a validação das análises.

Neste trabalho, foram realizadas análises provenientes de comparações de três experimentos independentes (replicatas biológicas), observando a expressão qualitativa (presença ou não de determinado spot) ou quantitativa.

3.3.4 Retirada e processamento dos spots; identificação por espectrometria de massas

Para a análise por espectrometria de massas, os *spots* foram cortados manualmente do gel e recolhidos em tubos tipo eppendorf. Inicialmente os spots foram descorados em solução de acetonitrila (ACN) 50% (p/v) / bicarbonato de amônio 25mM, pH8.0. Após o tempo necessário, o descorante foi removido, sendo adicionado a cada tubo ACN 100%, com incubação por 5 minutos sob agitação contínua. Os tubos foram colocados então em evaporador a vácuo (Speed Vac – Savant) por 15 minutos. Em seguida, foi feita a digestão trípica dos spots, adicionando-se 10 µL de solução de tripsina a 20 ng/µL (Tripsin Gold, Mass Spectrometry Grade – PROMEGA). Após 1 hora de incubação, o excesso de solução foi removido, sendo adicionado 20µl de solução de bicarbonato de amônio 50 mM e os tubos incubados por 16 horas, a 37 °C.

Ao término da incubação os tubos foram sonicados por 10 minutos e em seguida agitados em vórtex. A solução resultante dessa 1ª digestão foi transferida para tubos limpos e aos spots foi adicionado 30µl de solução de ácido fórmico 5% (v/v)/ ACN 50% (v/v) para a re-extração do material. Os tubos foram agitados em vortex por 20 minutos. A solução foi acrescentada à anterior e o processo de re-extração foi repetido mais uma vez, somando-se um volume final de aproximadamente 60µl. A amostra foi concentrada no evaporador à vácuo até o volume aproximado de 10µl. Posteriormente as amostras foram dessalinizadas em ponteiros contendo resina de fase reversa (Zip Tip C18 – Millipore) seguindo o protocolo do fabricante.

As amostras dessalinizadas foram analisadas em espectrômetro de massas MALDI-TOF TOF 4700 Proteomics Analyser (Applied Biosystems) da Plataforma de Espectrometria de Massas/PDTIS (Laboratório de Toxinologia, IOC-FIOCRUZ).

Os espectros obtidos foram analisados utilizando o programa Mascot versão 2.2 (www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS).

Para a identificação das proteínas realizamos pesquisa contra o banco de dados NCBI nr (“National Center for Biotechnology Information) sem restrição taxonômica, usando-se os parâmetros que constam na tabela 3.1.

Tabela 3.1: Parâmetros utilizados nas buscas com o programa Mascot

Database	NCBIInr
Taxonomy	All entries
Enzyme	Trypsin
Allow up to	2 missed cleavages
Fixed modification	Carbamidomethy (C)
Variable modification	Oxidation (M)
Peptide tol	50 ppm
MS/MS tol	0,6 Da
Peptide charge	+1 Da
Instrument	Maldi TOF TOF

3.4 Ensaios Imunoenzimáticos (ELISAs)

Nesse estudo os níveis de MMP-9, Fator Tecidual, Dímero D e Fator de von Willebrand no soro de pacientes de hanseníase e/ou lisado de células THP-1 foram determinados por ELISA utilizando-se, respectivamente, os Kits comerciais: DuoSET® ELISA Development Systems (R&D systems), Tissue Factor Human Elisa Kit (ABCAM), e von Willebrand Factor Human ELISA Kit (ABCAM), que foram processados de acordo com as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em espectrofotômetro para microplaca com filtro de 450 nm. Para a quantificação das amostras, a medida da absorbância obtida foi comparada com os padrões através de uma correlação matemática por regressão linear dos dados da curva padrão. A análise estatística dos resultados deste estudo foi realizada através do software GraphPad Prism VS 5, utilizando-se o teste t não pareado.

3.5 Colaboração Fiocruz-Laboratório Sérgio Franco

Para a realização dos testes de Tempo de Protrombina (PT) e Tempo de Tromboplastina Parcial ativada (aPTT), fibrinogênio, Dímero-D, Anti-cardiolipina (IgM) e Lipidograma, foi firmada uma parceria com o Laboratório Sérgio Franco. O laboratório Sérgio Franco é uma empresa que trabalha há décadas no campo de análises clínicas, com reconhecimento nacional na área de medicina diagnóstica.

Para os testes PT, aPTT e dosagem de fibrinogênio, o sangue periférico foi colhido em tubo BD Vacuntanier contendo citrato de sódio. Empregou-se método coagulométrico automatizado nos testes de PT e APTT, enquanto o fibrinogênio foi dosado através do método de Clauss automatizado. Para a avaliação de Dímeros-D, foi utilizado plasma citratado congelado imediatamente após a centrifugação e utilizado o método Imunoturbidimétrico. A dosagem de Anti-cardiolipina foi realizada em soro através do método ImmunoCAP. Especificamente para avaliação do lipidograma o sangue foi colhido em tubo do tipo soro-gel para obtenção do soro. As dosagens do lipidograma foram realizadas por método enzimático colorimétrico. Após os procedimentos de coleta e processamento, as amostras devidamente acondicionadas eram encaminhadas ao Núcleo Técnico-científico, situado na Rodovia Rio-Petrópolis.

3.6 Processamento de rotina e colorações de fragmentos de pele obtidos por biópsia

As biópsias de pele foram realizadas sobre lesão típica (escolhida no exame clínico). O fragmento de pele obtido pela biópsia foi então fixado em formol tamponado a 10% e incluída em parafina, após desidratação e clarificação. Cortes seriados, cortados em micrótomo, com 5 µm de espessura foram corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS) para a visualização de glicoconjugados e Alcian blue pH 1 e pH 2,5, para a visualização de glicosaminoglicanos sulfatados e totais, respectivamente.

As lâminas foram analisadas de forma descritiva em microscópio ótico e os aspectos considerados relevantes foram registrados em microfotografias

3.7 Imunofluorescência

Fragmentos de pele obtidos por biópsia, processados e congelados foram permeabilizados com tampão de permeabilização (Soro fetal bovino 5% e Triton X-100 0,01% em PBS) por 20 min à temperatura ambiente. Em seguida foram lavados em PBS 1X por 5 minutos e incubados *overnight* com anticorpo monoclonal anti-fator tecidual (diluição 1:100 v/v). Em seguida foram realizadas três lavagens com PBS 1X por 5 min e incubação com o anticorpo secundário Alexa 555 (Life Technologies, EUA) diluído (1:250 v/v) e anticorpo anti CD68-FITC 1:50 v/v) em solução de bloqueio/permeabilização por 2h em temperatura ambiente. Por fim, os núcleos foram corados com DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindole, Sigma-Aldrich), as lamínas lavadas três vezes com PBS 1X por 5 min e montadas com lamínulas de vidro contendo 3 µL de solução ProLong[®] Gold Antifade (Life Technologies, EUA) e seladas com Entellan[®] (Merck, Alemanha).

Foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios utilizando-se o microscópio invertido de fluorescência Zeiss Axio Observer com sistema de iluminação Colibri com objetiva Plan-neofluar 40X com 1.4 de abertura numérica (Zeiss). As imagens foram registradas em câmera monocromática HMR (Zeiss).

4.1 Perfil bidimensional de proteínas do agregado lipídico

A análise proteômica da massa lipídica revelou uma grande quantidade de fibrina(ogênio), albumina e imunoglobulinas presente na constituição do agregado lipídico, demonstrando que o mesmo trata-se de fato de um coágulo, motivo pelo qual, a partir deste momento, o denominamos **coágulo hansênico** (Figura 4.1). A partir desse momento ficou claro que estávamos diante de um coágulo e, e não de um agregado lipídico, como se acreditava até então, embora o conteúdo lipídico no coágulo hansênico seja cerca de 10 vezes maior que o do coágulo gerado no plasma de pacientes sadios (Figura 4.2).

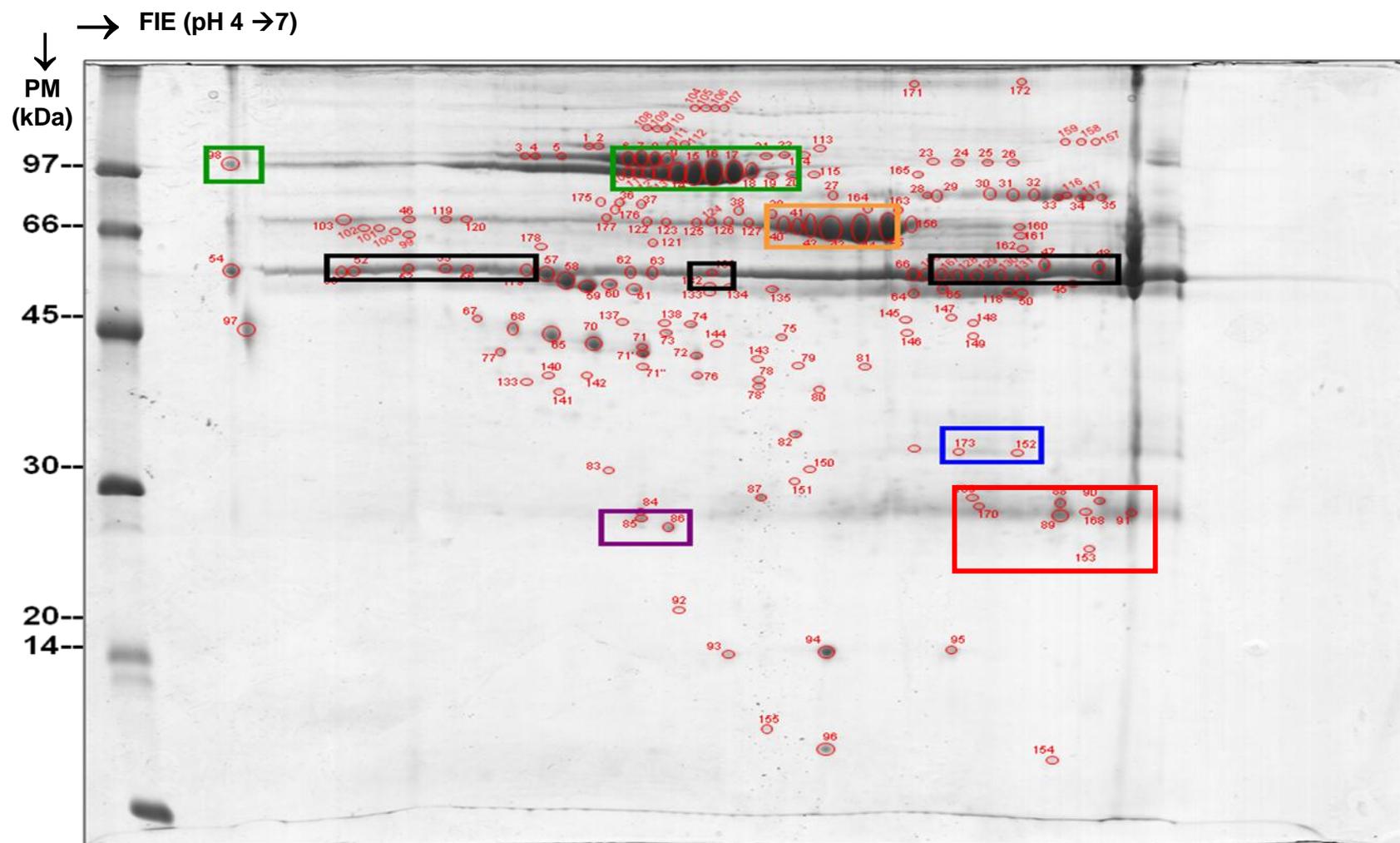


Figura 4.1: 2D-Eletroforese do extrato protéico obtido do coágulo hansênico. Foram aplicados 500µg de proteínas. O gel foi corado por *Comassie blue*. PM: Peso Molecular. FIE: Focalização Isoelétrica. Spots marcados com linha laranja: regiões ricas em albumina; linha preta: regiões ricas em fibrina beta, linha verde: regiões ricas em fibrina gama, linha azul: regiões ricas em fibrina alfa; linha roxa: apoliproteína A1; linha vermelha: regiões ricas em imunoglobulinas.

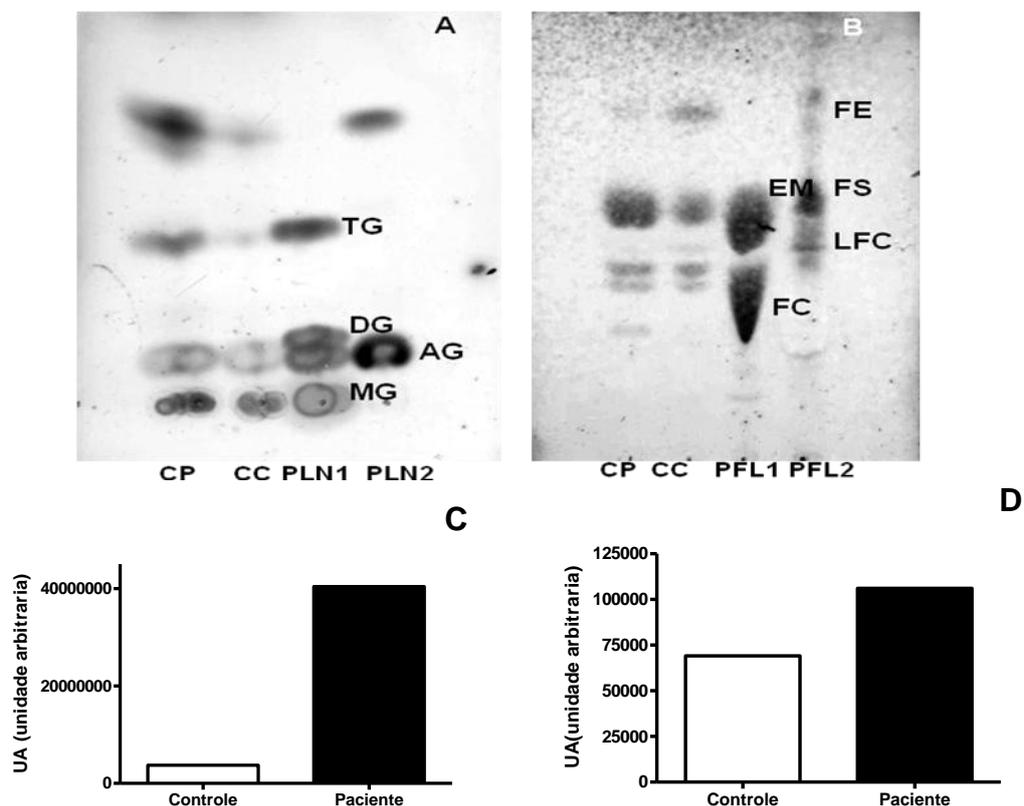


Figura 4.2: HPTLC (*high performance thin layer chromatography*) dos lipídeos extraídos do coágulo hansênico e coágulo controle. A) Perfil de lipídeos neutros. B) Perfil de fosfolipídeos. C) e D) Quantificação de A e B, respectivamente, utilizando-se o software *Image J*. A extração de lipídeos foi realizada segundo metodologia descrita por Bligh & Dyer (1989). Em seguida, o extrato lipídico foi aplicado em placas de HPTLC, e desenvolvidos na mistura de solventes Hexano:Éter:Ácido Acético (15:10:0,25 v/v/v) e Hexano:Clorofórmio:Ácido Acético (20:5:0,25 v/v/v) para lipídeos neutros e Clorofórmio:Metanol:Acetona:Ácido Acético:Água (10:3,25:3,52:3:2 v/v/v/v/v) para fosfolipídeos. A revelação foi feita com Iodo e após digitalização da placa, a mesma foi exposta a Reagente de *Sharring* (10% ácido fosfórico, 8% sulfato de cobre), e aquecida a 200°C por 10 minutos. CP: Coágulo paciente. CC: Coágulo Controle. PLN1: Padrão de lipídeos neutros 1. PLN2: Padrão de lipídeos neutros 2. PFL1 Padrão de fosfolipídeos 1. PFL2: Padrão de fosfolipídeos neutros 2. TG: triglicerídeos. DG: Diglicerídeos. MG: Monoglicerídeos. AG: Ácidos graxos. EM: Esfingomielina, FC: Fosfatidilcolina. FE: Fosfatidiletanolamina. FS: Fosfatidilserina. LFC: Lisofosfatidilcolina.

4.2 Perfil bidimensional de proteínas do coágulo hansênico e coágulo controle

A partir desse momento, nosso interesse voltou-se a tentar compreender o porquê da formação desse coágulo no soro de pacientes hansenianos. Com esse objetivo, realizamos a análise proteômica comparativa entre coágulos hansênicos e coágulos controles, formados através da adição de cloreto de cálcio (5M) a plasma de doadores sadios colhidos em tubos com citrato de sódio como anticoagulante.

Para fins comparativos, foi feita uma análise em SDS-PAGE com extratos protéicos obtido coágulo dos pacientes e do coágulo induzido no plasma de indivíduos saudáveis, além de um homogenato de plaquetas (figura 4.3). A análise do gel demonstra a semelhança dos perfis protéicos das duas amostras maceradas, indicando uma composição similar. Também é possível perceber os perfis completamente distintos entre as amostras de coágulos e do homogenato de plaquetas, descartando a hipótese inicial de que o coágulo era constituído essencialmente da aglomeração de plaquetas.

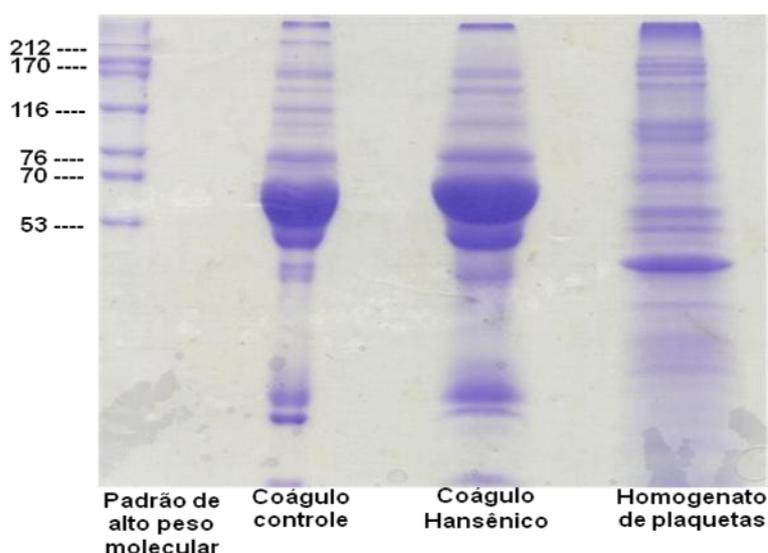


Figura 4.3: SDS-PAGE comparativa dos extratos protéicos do coágulo de paciente e de coágulo induzido. Foram aplicadas 30µg de proteínas em cada *lane*.

Em seguida esses extratos proteicos foram analisados por eletroforese bidimensional (Figura 4.4). Destacamos cinco regiões onde foram encontradas maiores divergências entre os dois perfis.

As imagens bidimensionais foram analisadas através do programa PDQuest (BioRad). A Figura 4.5 mostra a análise comparativa das regiões 1, 3, 4 e 5.

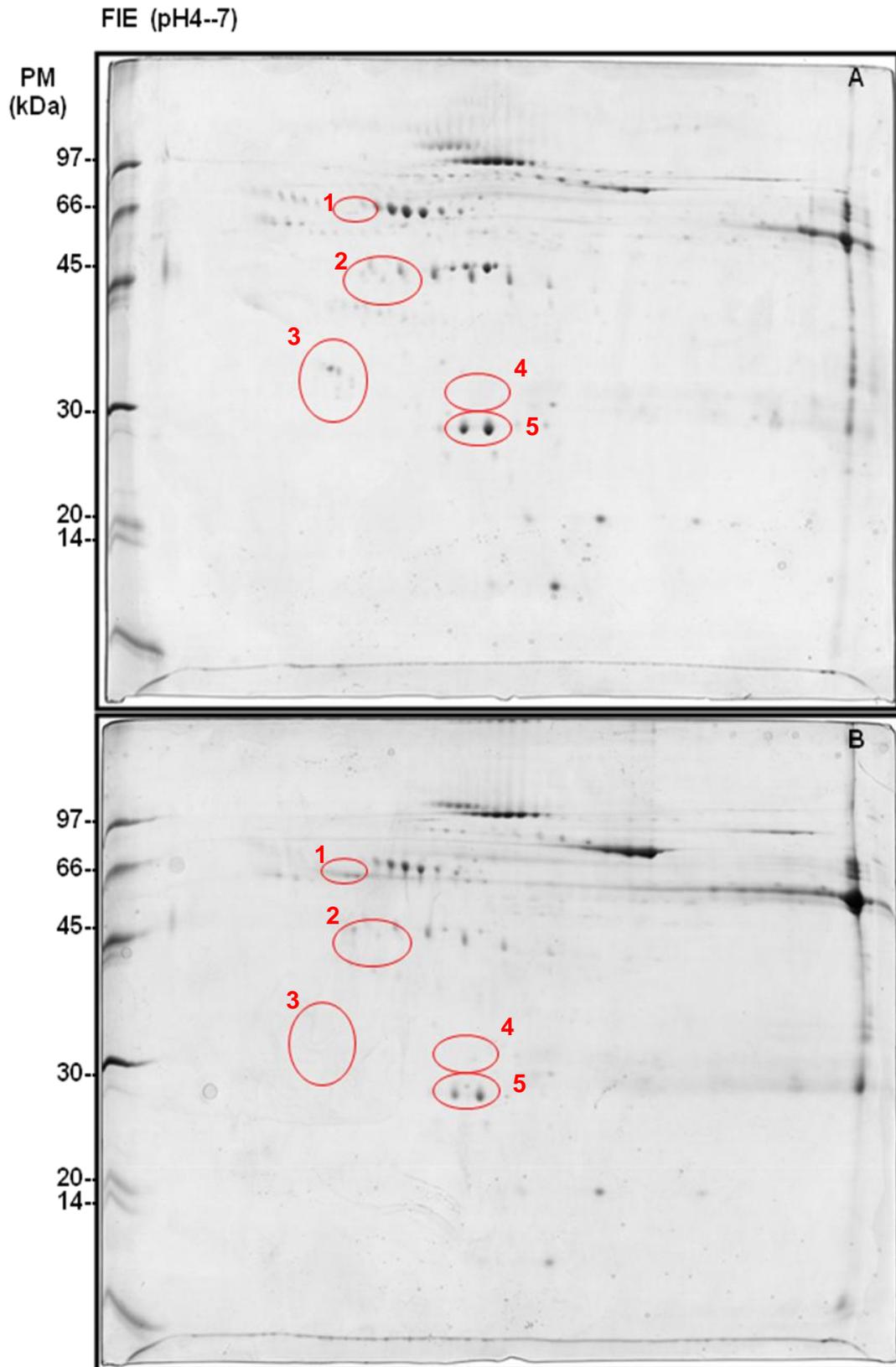


Figura 4.4: Géis bidimensionais (2D-Eletroforese) representativos do perfil proteico do coágulo hansênico e coágulo controle. A) Coágulo Controle. B) Coágulo Hansênico. Foram aplicados 600 μ g de proteínas. O gel foi corado por *Comassie blue*. PM: Peso Molecular. IEF: Focalização Isoelétrica.

Regiões marcadas em vermelho representam spots diferencialmente expressos entre coágulo hansênico e coágulo controle.

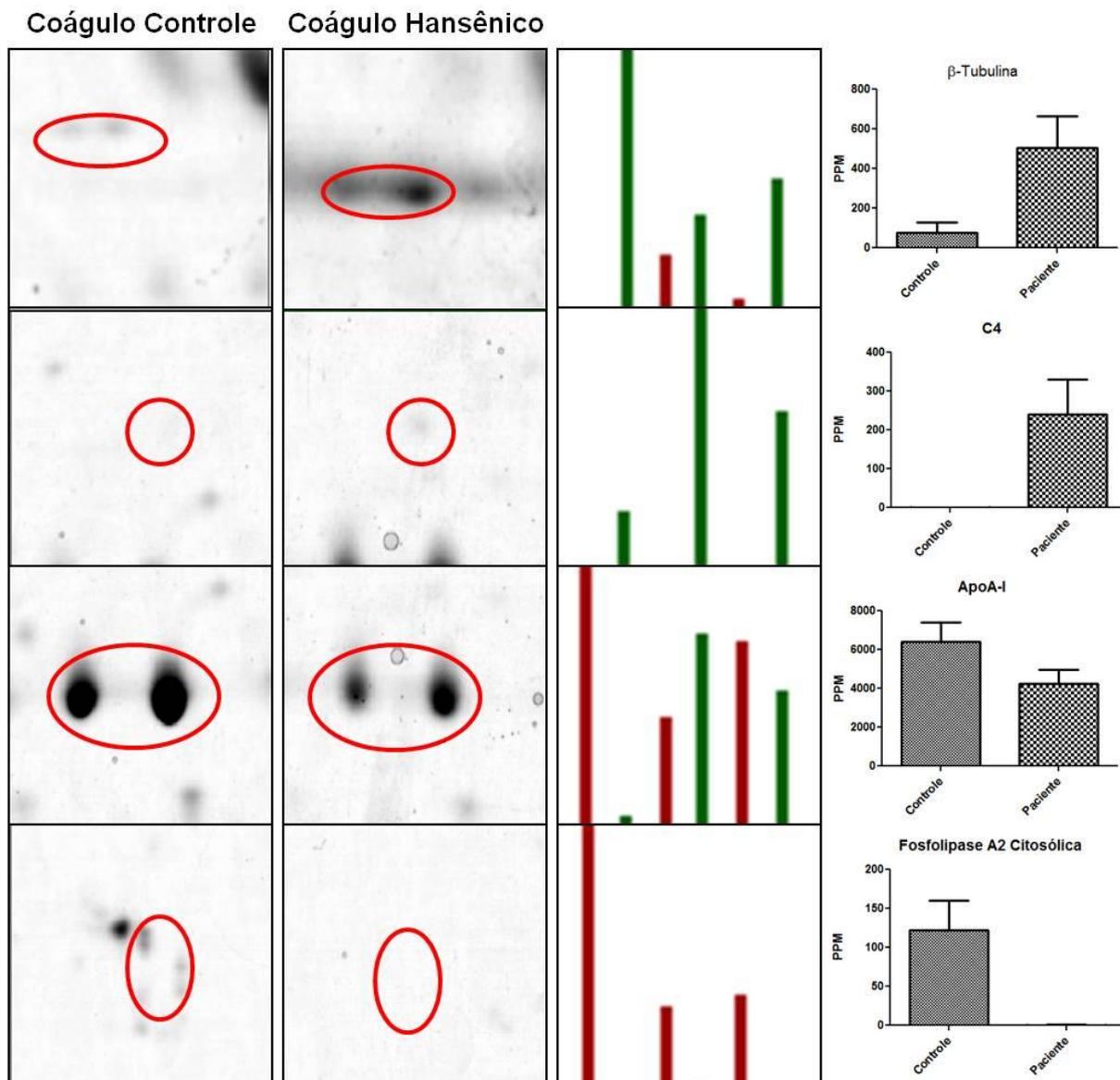


Figura 4.5: Análise comparativa das proteínas do coágulo hansênico e coágulo controle. (A) Detalhe dos géis 2D mostrando spots diferencialmente expressos entre CH e CC(N=3). (B) Gráfico gerado pelo programa PDQuest mostrando o PPM dos spots assinalados. As barras vermelhas demonstram a quantidade em PPM de todas as amostras denominadas Coágulo controle e as barras verdes os Coágulos hansênicos.

Das regiões destacadas foram extraídos cerca de 25 spots de cada gel. Ao todo foram processados 137 spots do conjunto das replicatas biológicas. A análise por espectrometria de massas identificou 120 proteínas, destas 11 encontravam-se diferencialmente expressas. Três estavam presentes somente no coágulo controle, quatro somente no coágulo hansênico, três superexpressas no coágulo controle em

relação ao coágulo hansênico e uma superexpressa no coágulo hansênico em relação ao coágulo controle (Tabela 4.1 e 4.2).

Tabela 4.1: Sumário de proteínas identificadas somente no coágulo hansênico ou coágulo controle

Proteína	Função	Amostra
Fosfolipase A2	Fosfolipase que quebra ligação sn-2 de fosfolípidos liberando ácido aracdônico	Coágulo Controle
KNG1 - <i>kininogen-1 isoform 2 precursor</i>	Regula vasodilatação e resposta imune (permeabilidade vascular)	Coágulo controle
Tropomiosina	Controla migração e divisão celular alterando afinidade de actina	Coágulo Controle
Complemento C3	Seu papel é central no processo de ativação da parte comum para as vias clássica e alternativa	Coágulo hansênico
Complemento C4	A cadeia 4 alfa da cascata de complemento é clivada em C4 anafilotoxina, envolvida no auxílio da interação antígeno anticorpo da via clássica do complemento.	Coágulo hansênico
Haptoglobina	Haptoglobina é responsável pelo sequestro de hemoglobina livre, tem efeito antioxidante e também é classificada como proteína de fase aguda.	Coágulo Hansênico
IHRP - inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein	Proteína de fase aguda (APP), envolvida na resposta TH2.	Coágulo hansênico

Tabela 4.2: Sumário de proteínas identificadas por MS/MS que estavam super expressas ou menos expressas no coágulo hansênico em relação ao coágulo controle.

Proteína	Função	
Apolipoproteína AI	Principal componente das lipoproteínas de alta densidade (HDL). Cofator da lecitina colesterol acil transferase (LCTA), também envolvida no transporte de colesterol celular livre.	↓
HAP-1 - haptoglobin-1 precursor	Proteína sérica envolvida em sequestro de hemoglobina livre. Tem efeito antioxidante e também é classificada como proteína de fase aguda.	↓
Actina	Citoesqueleto, provavelmente oriundo de plaquetas	↓
β-tubulina	Citoesqueleto, provavelmente oriundo de plaquetas	↑

4.3 Avaliação dos níveis de Imunoglobulinas Reativas a Fosfolípidos.

A presença de anticorpos anti-fosfolípidos é descrita em muitas doenças autoimunes e infecciosas, sendo muitas vezes associados a um estado pró-trombótico. Na hanseníase o anticorpo anti-cardiolipina (aCL) é encontrado em aproximadamente 43% dos pacientes, e destes pacientes cerca de 45% apresentam também o anticorpo anti- β 2 GPI (anti beta 2 glicoproteína 1) (Sène, 2008). O caráter trombogênico do aCL nas Síndromes do anticorpo antifosfolípido (APS) está intimamente ligado à presença de anti- β 2 GPI (Sène, 2008). Ao encontramos quantidade expressiva de imunoglobulinas no proteoma do coágulo hanseníase nos interessamos em investigar a possibilidade da participação de anticorpos anti-fosfolípidos na formação deste coágulo.

Para determinar se os pacientes de hanseníase que apresentavam o coágulo hanseníase tinham níveis mais elevados de anticorpos anti-fosfolípidos em relação aos pacientes que não apresentavam esse fenômeno, avaliamos dois tipos de anticorpos (aCL e o anti- β 2 GPI) por ensaio do tipo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

Na Figura 4.6 estão mostrados os resultados referentes ao anticorpo anti- β 2 GPI. Não foram detectadas diferenças estatísticas quanto aos níveis de anticorpos IgG anti- β 2 GPI entre os diferentes grupos. Nossos dados estão de acordo com a literatura (Ribeiro *et al*, 2011) que aponta o mesmo em outras coortes de pacientes de hanseníase. Dessa forma, os dados obtidos não apontam para a participação de IgG anti- β 2 GPI na formação do coágulo hanseníase.

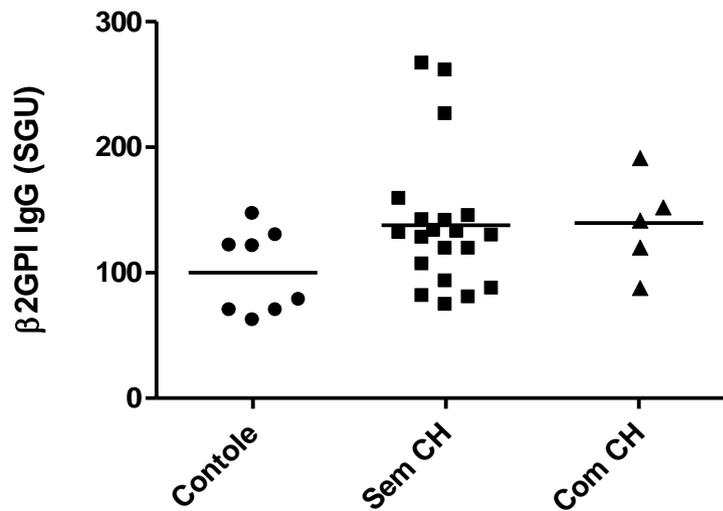


Figura 4.6: Níveis de IgG B2GPI no soro de pacientes de hanseníase.

Realizamos também a avaliação dos níveis de anticorpos anti-cardiolipina (Isotipos IgG e IgM) nos soros dos pacientes que apresentaram o coágulo hansênico em diferentes momentos. No soro colhido na data na qual o paciente apresentou o coágulo hansênico, em uma coleta em uma data anterior e uma coleta em uma data posterior ao aparecimento do coágulo hansênico. Essa dosagem foi feita através de ensaio enzimático em colaboração como laboratório Sérgio Franco. Na figura 4.7 está representado o gráfico com apenas a dosagem de IgM aCL, visto que não foram encontrados níveis detectáveis de reatividade para IgG aCL (dados não mostrados).

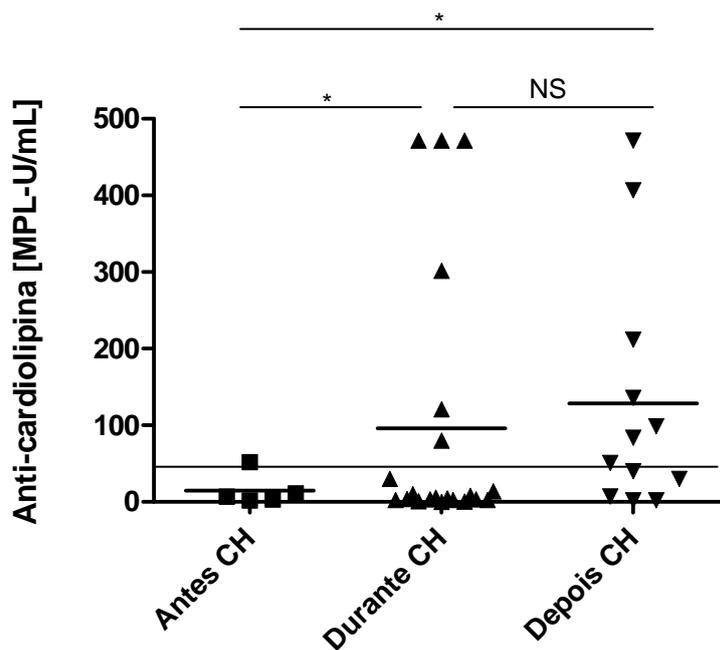


Figura 4.7: Níveis de IgM Anticardiolipina no soro de pacientes de hanseníase. Antes CH significa soros colhidos em data anterior à data de coleta do soro que apresentou o coágulo hansênico (durante CH), assim como Depois CH representa soro colhido após a data de aparecimento do CH. * $p < 0.05$; NS: não significativo.

Dos soros colhidos antes do coágulo hansênico, apenas 1 apresentou reatividade para IgM anti-aCL (N=5). Por outro lado dos soros que apresentaram a formação do coágulo hansênico, 7 apresentaram altos títulos de IgM anti-aCL (N=21), sendo que destes, 3 já estavam em reação na data da coleta. Dos soros colhidos após o aparecimento do coágulo hansênico, 8 apresentaram reatividade (N=12), sendo que destes, 3 já estavam em um quadro de eritema nodoso.

É importante ressaltar que nem todas as amostras se encontram pareadas, visto que nem todos os pacientes possuíam coletas em tempos anteriores e/ou posteriores às coletas nas quais o coágulo hansênico foi detectado.

4.4 Avaliação de fatores envolvidos na coagulação em soro de pacientes com coágulo hansênico

O Fator de von Willebrand (FvW) é uma glicoproteína multimérica de alto peso molecular, produzida pelas células endoteliais e megacariócitos, presente no plasma e nas plaquetas. O FvW tem duas funções principais: ligar-se ao colágeno presente no subendotélio e nas plaquetas, promovendo a formação do tampão plaquetário no local da lesão endotelial; e ligar e transportar o fator VIII, protegendo-o da degradação proteolítica no plasma. O envolvimento dessa glicoproteína na interação de adesão de agentes patológicos já foi demonstrado na endocardite (Pappelbaum, 2013). Observamos um aumento nos níveis desse importante fator no soro colhido no momento em que o paciente apresentou o coágulo hansênico (Figura 4.8A).

Paralelamente, analisamos os níveis de outro fator importante para o processo de coagulação, o fator tecidual. Este fator estava significativamente aumentado nos soros colhidos de pacientes que apresentaram o coágulo hansênico no momento do acontecimento desse evento e em coleta posterior, em relação aos soros colhidos antes do surgimento desse coágulo (Figura 4.8B).

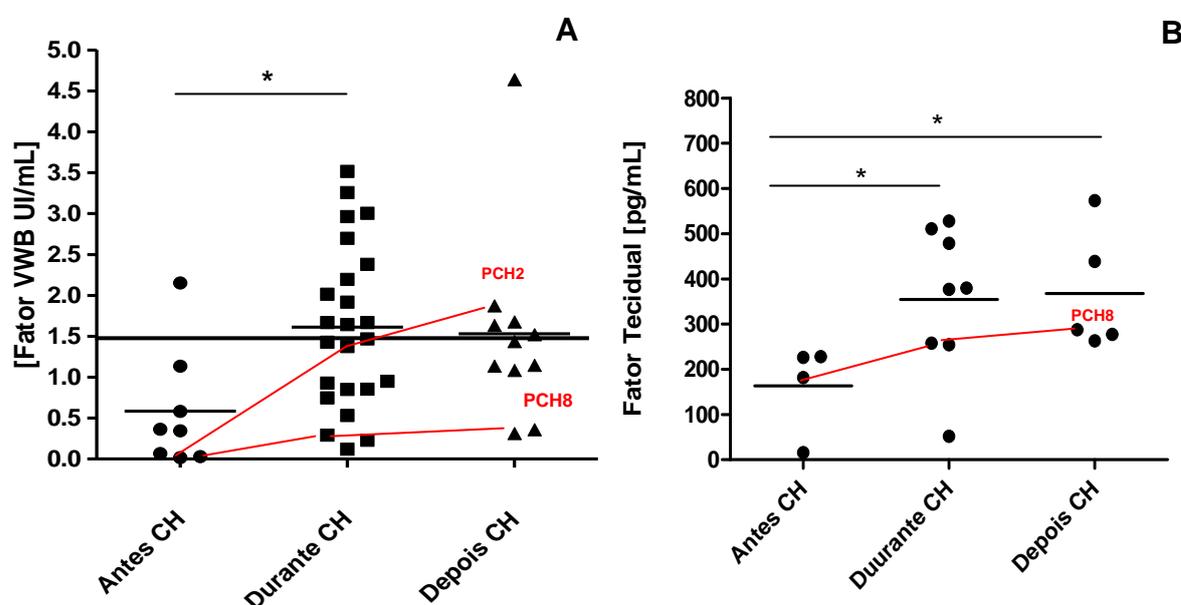


Figura 4.8: Nível de fatores de coagulação no soro de pacientes de hanseníase. A) Níveis séricos de Fator de von Willebrand. A linha traçada em 1.5 UI/mL representa o nível normal encontrado no soro. B) Níveis séricos de Fator Tecidual. Antes CH significa soros colhidos em data anterior ao surgimento do coágulo hansênico (durante CH), assim como Depois CH representa soro colhido após a data de aparecimento do CH. As linhas vermelhas representam as trajetórias de dois pacientes. * $p < 0.05$.

É importante ressaltar que nem todas as amostras se encontram pareadas, visto que nem todos os pacientes possuíam coletas em tempos anteriores e/ou posteriores às coletas nas quais o coágulo hansênico foi detectado. Os pacientes que possuíam as 3 coletas estão sinalizados no gráfico com uma linha vermelha, com a coleta anterior sendo realizada de 1-2 meses antes da coleta com a detecção do coágulo hansênico e a coleta posterior após 1 ano da detecção do coágulo hansênico.

4.5 Avaliação dos níveis séricos de MMP-9 em pacientes com coágulo hansênico

Em um estudo recente (Teles, 2010), foi demonstrado o aumento na expressão de MMP-9, um integrante da família das metaloproteinases de matriz que são responsáveis pelo remodelamento da matriz extracelular, no soro de pacientes lepromatosos. O aumento desta molécula poderia estar relacionado não só com o remodelamento da matriz extracelular, como também à exposição de moléculas com potencial trombogênico no lúmen do vaso sanguíneo, levando à agregação de plaquetas e à formação de trombo.

Os níveis séricos de MMP-9 nas amostras dos pacientes colhidas antes, durante e após a ocorrência do Coágulo Hansênico não se mostraram significativamente elevados em relação aos do grupo controle (figura 4.9).

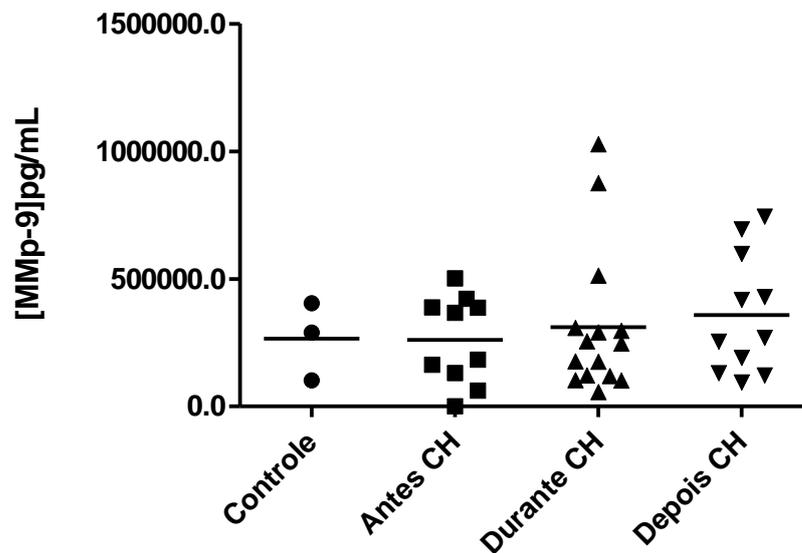


Figura 4.9: Níveis de MMP-9 nos soros dos pacientes que apresentaram o Coágulo Hansênico em diferentes momentos.

4.6 Análise dos parâmetros de coagulação em pacientes multibacilares em reação hansênica tipo II e pacientes não reacionais.

Uma vez que cerca de 35% dos pacientes que apresentaram o coágulo hansênico estavam em reação tipo 2, ou desenvolveram o episódio reacional posteriormente à data da coleta de sangue na qual surgiu o coágulo, resolvemos então avaliar se esses pacientes apresentavam parâmetros de coagulação alterados. Estas análises foram feitas em colaboração com o Laboratório de Análises Clínicas Sérgio Franco.

Inicialmente foram avaliados os tempos de protrombina e tromboplastina parcial ativada, compilados na tabela 4.3.

O tempo de tromboplastina parcial ativada (aPTT) auxilia na avaliação da via intrínseca e via comum que envolvem os fatores de coagulação I, II, V, VIII, IX, X, XI e XII. O aPTT mede o tempo que leva para a formação do coágulo após a reposição de cálcio em plasma citratado pré-incubado com fosfolipídeos e agente ativador da via de contato (tromboplastina parcial).

Valores aumentados nesse teste indicam, entre outras coisas, deficiência ou consumo exagerado de um desses fatores, como ocorre na coagulação intravascular disseminada, presença de anticorpos antifosfolipídeos ou uso de anticoagulantes, como a heparina. De acordo com o observado na ficha de acompanhamento clínico desses pacientes, nenhum deles afirmou o uso de anticoagulantes.

O tempo de protrombina é um teste para avaliar a via extrínseca e a via comum, ou seja, os fatores VII, X, V, II e o fibrinogênio. Neste teste adicionamos ao plasma tromboplastina contendo fator tissular. Assim, o tempo de protrombina estará aumentado em casos de deficiência de fibrinogênio e de qualquer um dos fatores mencionados anteriormente, em pacientes que fazem uso de anticoagulantes antagonistas da vitamina K, nas doenças hepáticas e deficiência de vitamina K, pois os fatores II, VII e X são dependentes desta vitamina.

Os resultados estão mostrados na Tabela 4.3. Dois pacientes apresentaram alteração do PT, com atividade de protrombina abaixo de 70%. Por outro lado, dentre os 25 pacientes, 9 (36%) tiveram seu aPTT aumentado em relação aos valores de referência. Entretanto, não houve diferença entre os grupos, 4 pertenciam ao ENH e 5 ao NR.

Também avaliamos os níveis de fibrinogênio (Figura 4.10). Como a proteína C-reativa, o fibrinogênio é uma proteína de fase aguda e pode ser utilizado como um

marcador de inflamação e de risco coronariano, sendo que níveis altos de fibrinogênio indicam propensão à trombose arterial ou venosa. Seus níveis se elevam quando há inflamação ou lesão tecidual de qualquer causa. Essas elevações são temporárias, e desaparecem após cessar a causa. Podem ser detectados níveis altos com infecções agudas e câncer.

Como observado na figura 4.10, os pacientes multibacilares em reação apresentaram níveis de fibrinogênio estatisticamente aumentados em relação aos pacientes multibacilares não reacionais.

Tabela 4.3 Tempo de protrombina e tromboplastina parcialmente ativada em pacientes multibacilares reacionais e não reacionais

ID Paciente	TAP				TTPA (segundos)		
	TP Paciente/ Padrão (segundos)	Relação Cliente/ Padrão	Relação padrão internacional (INR)	Atividade de protrombina (70-100%)	Padrão	Paciente	Relação Paciente/ Padrão
LL 1	12.8/11	1.16	0.95	77.8	26.5	36.7	1.38
LL 2	10.9/10.7	1.01	1.01	98,6	26.0	31.7	1.22
LL 3	14.3/11.41	1.25	1.25	63.8	26.0	55.0	2.12
LL 4	14.1/11.0	1.28	1.27	69	28.5	36,3	1.27
LL 5	13.3/11.3	1.18	1.18	81.6	26	68.6	2.64
LL 6	12.2/13.3	1,08	1,08	84,2	26	34.7	1.33
LL 7	11/11.6	1.05	1.05	89.6	25	35.4	1.42
LL 8	11/10.9	0.99	0.99	101.7	28	26.7	0.95
LL 9	11/11.2	1.02	1.02	96.7	28	31.1	1.11
LL 10	10.6/11.1	1.05	1.05	92.6	28	34	1.21
LL 11	11/12.9	1.17	1.17	74.1	28	29.8	1.06
ENH 1	12.3/11	1.12	1.11	83.1%	26.5	29.4	1.11
ENH 2	14.3/11.4	1.25	1.25	62,3	26.0	35.7	1.37
ENH 3	12.8/11.4	1.12	1.12	79	26.0	26.7	1.03
ENH 4	11.7/11.0	1.06	1.06	90.3	28.5	31.2	1.09
ENH 5	13.3/11.0	1.18	1.20	75.5	28.5	32.1	1.13
ENH 6	11.9/11.0	1.08	1.08	88,6	28,00	32,6	1.16
ENH 7	11.5/14.3	1.24	1.24	73	28	31.7	1.13
ENH 8	12/11.3	1.25	1.06	93.7	26	32.6	1.25
ENH 9	14.3/11.5	1.24	1.24	70,5	28	32.2	1.15
ENH 10	13.2/11.5	1.15	1.14	80.2	28	47.8	1.71
ENH 11	12.1/11	1,19	1.10	83	26	34.6	1.33
ENH 12	12.6/11	1.15	0.99	77.4	28	32	1.14
ENH 13	-	-	1.14	75.1	-	42.7	-
ENH 14	10.6/12.8	1.21	1.21	73.5	28	40	1.44

¹ Os números destacados em vermelho indicam valores alterados em relação ao padrão.

² Valores aPTT alterados correspondem a 8 segundos além do valor do padrão

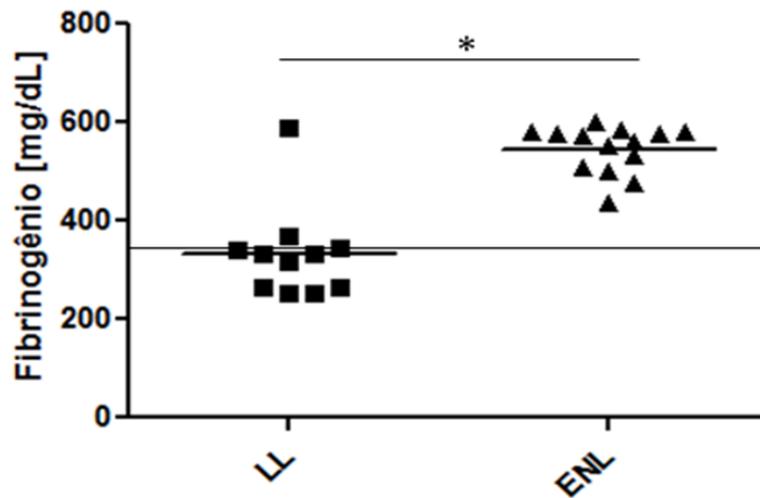


Figura 4.10: Níveis de fibrinogênio no soro de pacientes multibacilares (LL) e em reação tipo II (ENH). LL: Lepromatoso-lepromatoso (N=10) ENL: Eritema nodoso hansênico (N=14). *P<0.001.

Realizamos nestes mesmos plasmas a dosagem dos níveis de dímero-D (Figura 4.11). Os dímeros-D são produtos da degradação de fibrina já polimerizada, ou seja, indicam fibrinólise intravascular, sendo considerado um marcador importante no diagnóstico de coagulação intravascular.

Não encontramos diferenças significativas nos níveis de D-dímero de pacientes em reação tipo II em relação aos pacientes não reacionais, embora esses dois grupos tenham apresentado valores significativamente aumentados em relação ao grupo sadio.

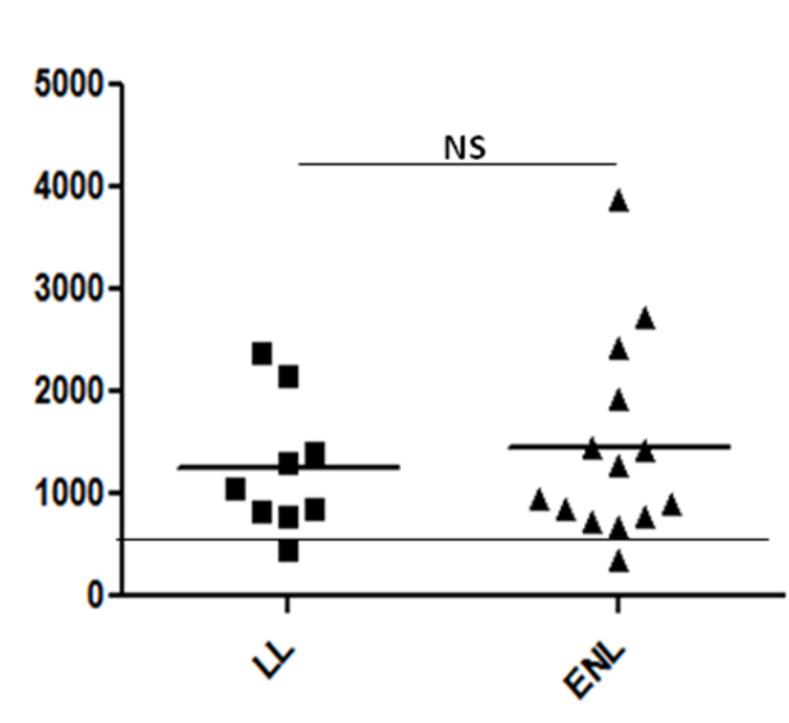


Figura 4.11: Níveis de Dímero-D no soro de pacientes multibacilares (LL) e em reação tipo II (ENL). LL: Lepromatoso-lepromatoso (N=10); ENH: Eritema nodoso hansênico (N=14). *P<0.001. **P=0.002. NS: não significativo

Existem outros fragmentos derivados da fibrina monomerizada, mas o dímero D é específico para a fibrina degradada após a polimerização, o que qualifica seu uso como marcador de fibrinólise de coágulo. O nível sérico do D-dímero reflete um estado pró-trombótico e, portanto, pode ser útil como marcador de risco de eventos cardiovasculares e tromboembólicos.

4.7 Avaliação dos lipídeos séricos em pacientes multibacilares não reacionais e em reação tipo II

Devido à grande quantidade de lipídeos encontrados no coágulo hansênico e já que 35% dos pacientes que apresentaram o coágulo hansênico apresentavam o quadro de eritema nodoso, avaliamos a concentração de lipídeos no soro de pacientes multibacilares não reacionais e no soro de pacientes em reação tipo II, que teoricamente, seriam os mais propensos à formação do coágulo hansênico. Foi feita dosagem dos seguintes constituintes: HDL, LDL, VLDL, Triglicerídeos e colesterol total em aparelhagem semi-automática. Os valores encontrados nas medições dos soros de pacientes com hanseníase lepromatosa não reacional e pacientes lepromatosos em reação tipo II estão expressos na figura 4.12.

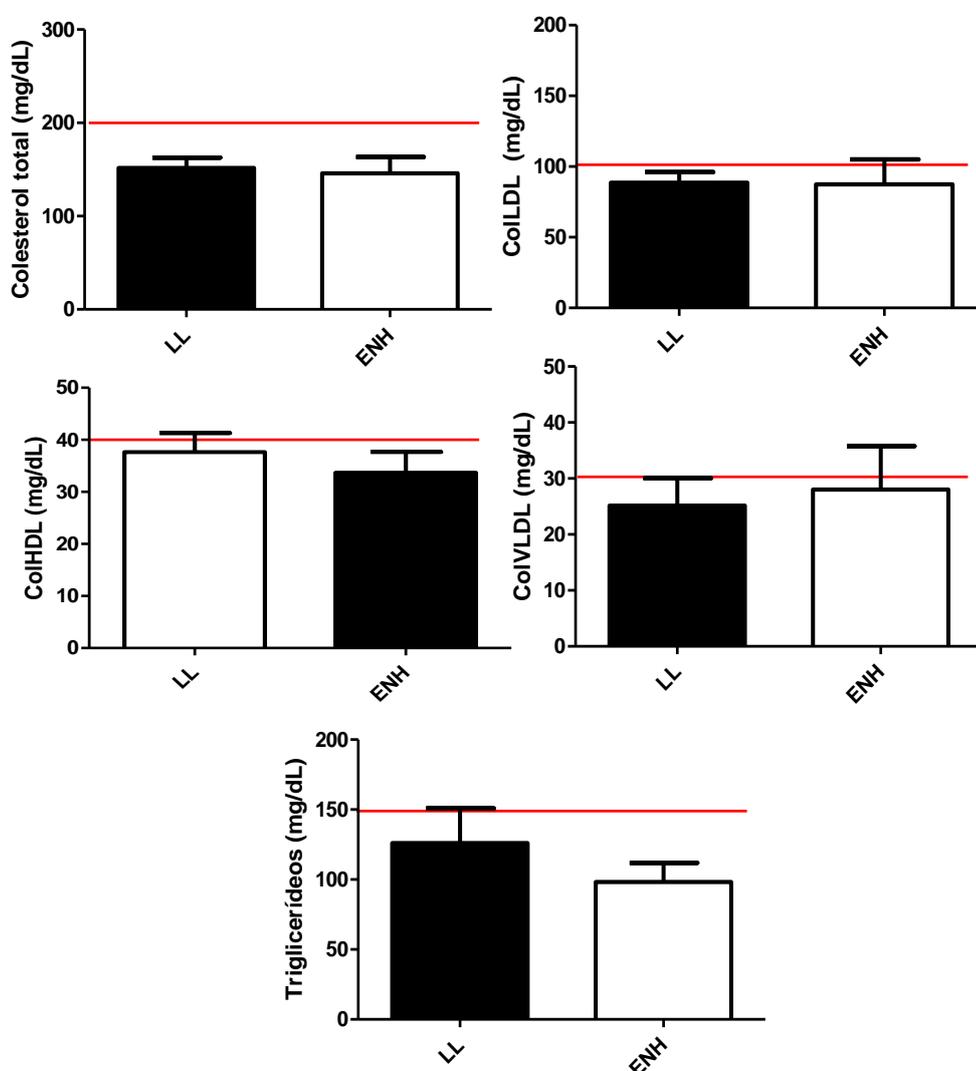
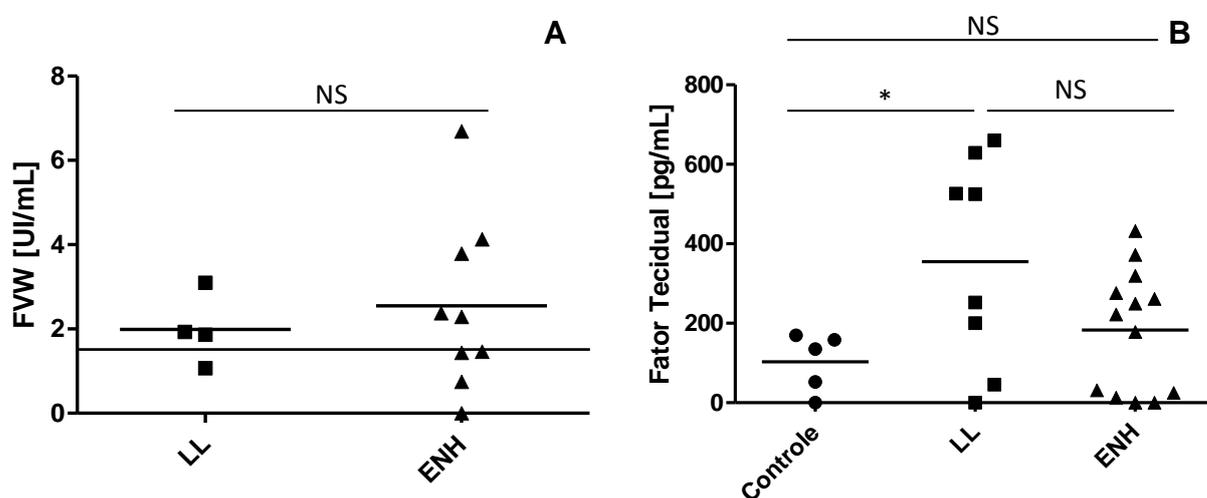


Figura 4.12: Lipidograma de pacientes multibacilares em reação tipo II e não reacionais. A linha vermelha indica os valores limites recomendados, sendo para colesterol total <200mg/dL; LDL <100mg/dL; HDL >40mg/dL, VLDL < 30mg/dL; Triglicerídeos < 150mg/dL.

Como podemos observar na figura 4.12, os pacientes de Hanseníase multibacilar apresentaram lipidograma normal em todos os parâmetros, havendo uma aparente redução de triglicérides nos pacientes reacionais (ENH), porém sem diferença estatística com relação aos multibacilares não reacionais (LL).

4.8 Avaliação dos níveis de Fator de Von Willebrand e Fator Tecidual no soro de pacientes multibacilares não reacionais e em reação tipo II

Uma vez observado que os níveis do Fator de von Willebrand e do Fator Tecidual estavam aumentados nas no soro dos pacientes que apresentaram o coágulo hansênico, avaliamos a presença desses fatores no soro dos pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais. Não encontramos diferenças significativas nos níveis desses dois fatores entre os dois grupos estudados (Figura 4.13.A e B), embora ambos tivessem valores aumentados em relação aos níveis considerados normais e aos controles, respectivamente.

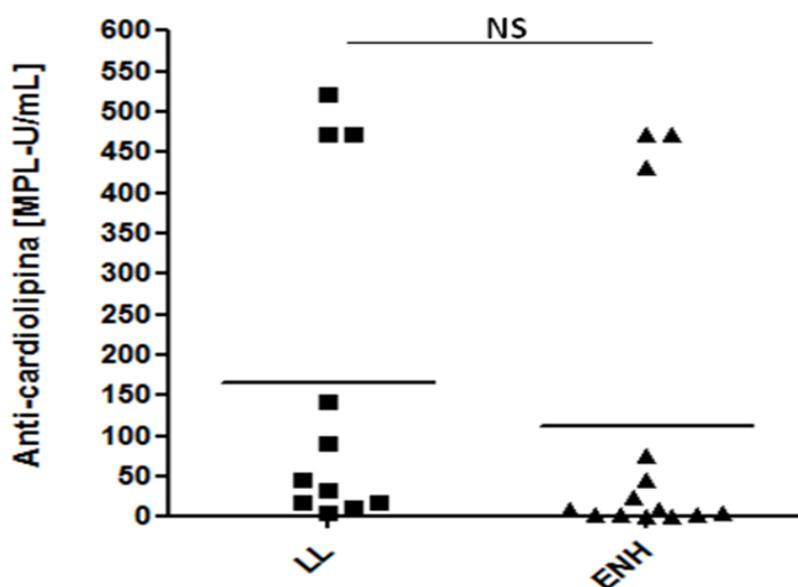


4.13 Níveis de Fator de Von Willebrand e Fator Tecidual no soro de pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais. LL: Lepromatoso-lepromatoso; ENH: Eritema nodoso hansênico *P<0.05. NS: não significativo A) Níveis séricos de fator Von Willebrand. Linha significa nível basal no soro. B) Níveis séricos de fator tecidual

4.9 Avaliação dos níveis de imunoglobulinas reativas a fosfolípidos no soro de pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais

Uma vez observado que os pacientes que apresentaram o coágulo possuíam níveis elevados de IgM anti-cardiolipina, realizamos a dosagem deste anticorpo antifosfolípido no soro de pacientes multibacilares em reação tipo II e em pacientes não reacionais. A presença destes anticorpos é considerada um fator de risco para o desenvolvimento de trombose e outras desordens, e no nosso estudo, poderia estar relacionado à formação do coágulo hansênico.

Após as análises não encontramos diferenças significativas entre esses 2 grupos, porém nossos dados parecem apontar uma tendência de alta, ou seja, pode ocorrer de uma análise envolvendo um número maior de indivíduos possa encontrar diferença estatística entre os grupos.



4.14: Níveis de IgM Anticardiolipina no soro de pacientes de Hanseníase multibacilar não reacional ou em reação tipo II. LL: Lepromatoso-lepromatoso (N=11); ENH: Eritema nodoso hansênico (N=14). * $p < 0.05$

Dos 11 pacientes multibacilares analisados, 54,5% apresentavam reatividade para IgM anti-cardiolipina (acima de 40 MPL-U/mL), enquanto que entre os pacientes multibacilares reacionais 36% apresentaram reatividade para este anticorpo.

4.10 Avaliação dos níveis séricos de MMP-9 em pacientes multibacilares em reação tipo II ou não reacionais

As metaloproteinases de matriz (MMPs) estão estreitamente ligadas ao remodelamento da matriz e ao dano tecidual em situações patológicas, podendo atuar como um importante fator na liberação de moléculas trombogênicas na corrente sanguínea. Teles e colaboradores (2009) observaram um aumento nos níveis de mRNA de MMP-9 e MMP-2 e das proteínas correspondentes, conjuntamente com o aumento dos níveis de expressão de TNF- α e IFN- γ nas lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide e em reação. As metaloproteinases também são correlacionadas com destruição generalizada do tecido em pacientes com tuberculose (Elkington *et al*, 2011). Por esse motivo, realizamos a dosagem de MMP-9 no soro de pacientes multibacilares em reação tipo II e em pacientes multibacilares não reacionais. Tanto os pacientes reacionais, quanto os não reacionais apresentaram níveis estatisticamente mais elevados que os dos controles.

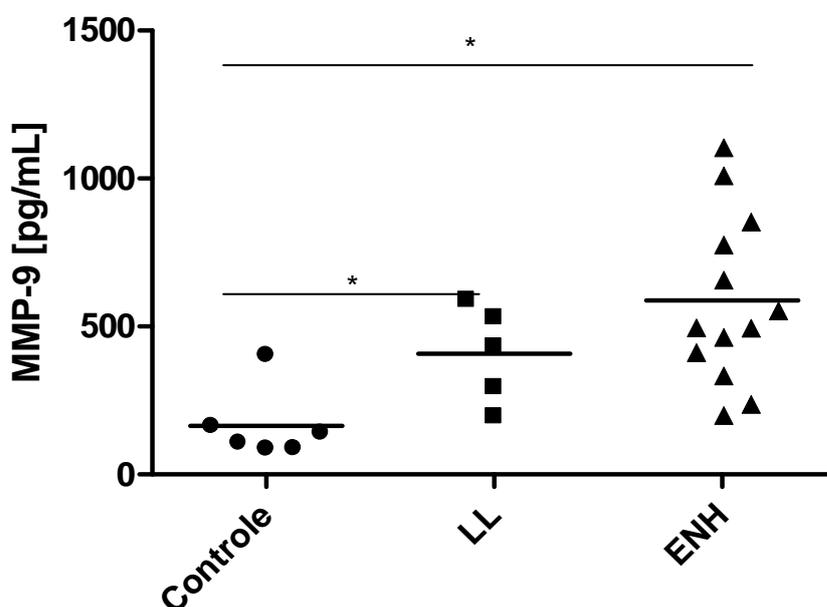


Figura 4.15: Análise dos níveis de Metaloproteinase-9 (MMP-9) no soro de pacientes hanseníacos multibacilares em reação tipo II ou não reacionais. * $p < 0.05$

Nossos dados corroboram com os que foram encontrados por Telles e colaboradores (2009) e acrescentam aos mesmos a descrição de aumento de MMP-9 em pacientes multibacilares não reacionais em relação aos controles.

4.11 Análise da expressão de fator tecidual nas lesões de pele de pacientes de hanseníase

A avaliação da expressão de fator tecidual também foi realizada em fragmentos de pele obtidos de lesões de pacientes multibacilares não reacionais, pacientes em reação tipo II, pacientes paucibacilares não reacionais e em fragmentos de pele de indivíduos saudáveis. Na figura 4.16 podemos notar a expressão de fator tecidual em células aparentemente CD68⁺ que embora raras, acontecem mais frequentemente na lesão do paciente em reação, quando comparado com a lesão dos pacientes multibacilares não reacionais e a dos pacientes paucibacilares. O CD68 é uma glicoproteína transmembrana altamente expressa por monócitos humanos e macrófagos teciduais. É um marcador de macrófagos em geral. A positividade é citoplasmática, pois a molécula encontra-se nos lisossomos. Neste caso, embora a indução da expressão de fator tecidual em monócitos através da infecção por uma micobactéria já tenha sido descrita (Kothari *et al*, 2012), podemos supor a participação de outras células, como as endoteliais, na expressão do fator tecidual nas lesões dos pacientes hanseníacos.

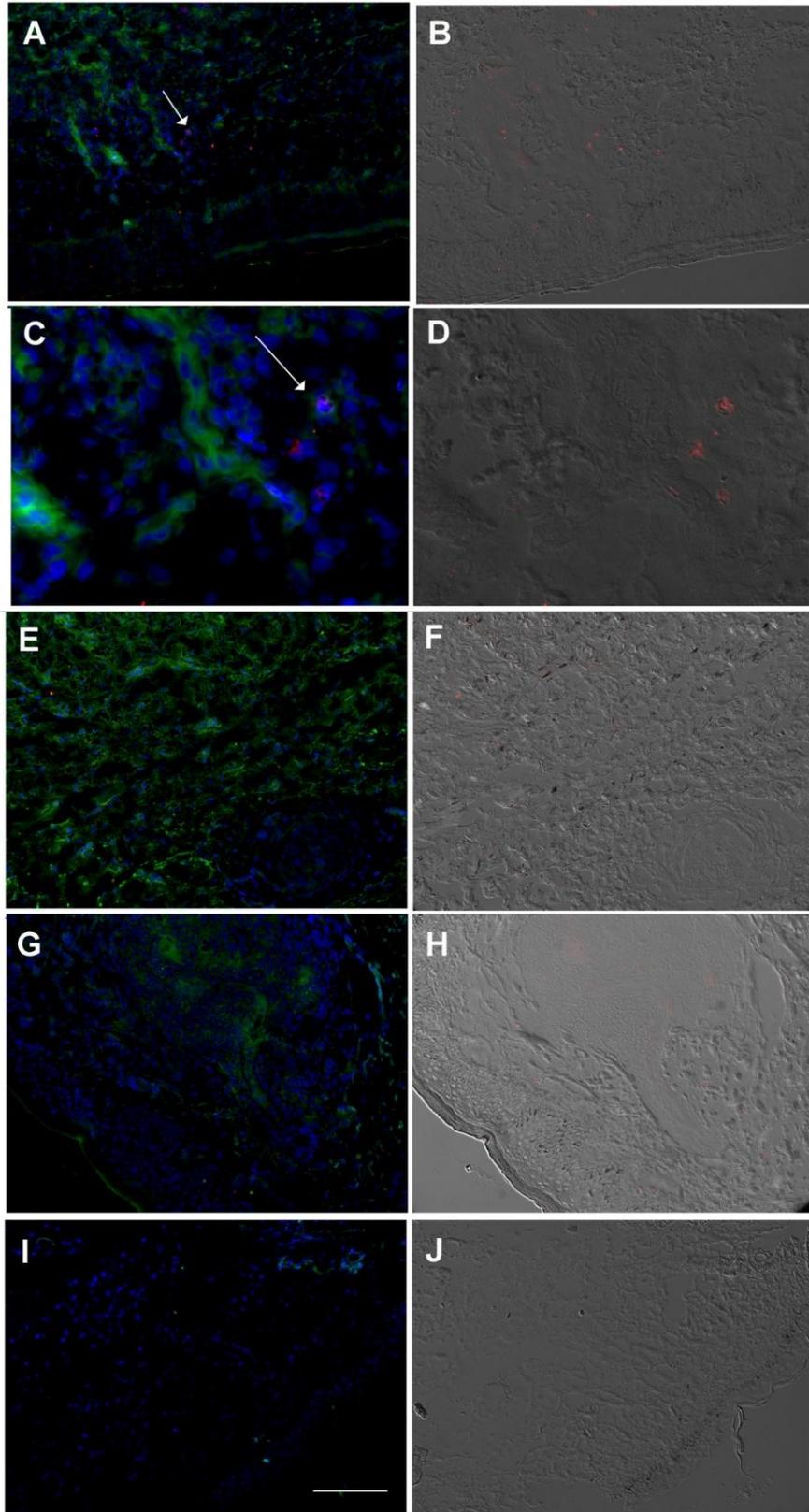


Figura 4.16: Expressão de fator tecidual em lesões de pele de pacientes acometidos pela hanseníase. Imagens representativas da marcação com anticorpo anti-fator tecidual (vermelho), Anti-CD68 (verde) e DAPI (azul). (A-B) imagem de fragmento de pele de paciente apresentando quadro de ENH. Seta indica células positivas para fator tecidual (C-D) Aumento da área apontada pela seta em (A-B), respectivamente. (E-F) imagem representativa de fragmento de pele de paciente LL. (G-H) imagem representativa de fragmento de pele de paciente BT. (I-J) imagem representativa de fragmento de pele de indivíduo sadio. Barra de escala representa 25 μ m em C e D e 100 μ m nos demais campos.

4.12 Análise da expressão de glicosaminoglicanos nas lesões de pele de pacientes de hanseníase

Acreditamos que a remodelação do tecido devido à ação de metaloproteínases e o dano tecidual acarretado pela grande quantidade de bacilos encontrados nas lesões de pele de pacientes multibacilares gere um subsequente aporte de moléculas extracelulares à corrente sanguínea, como os glicosaminoglicanos, cuja presença foi detectada no coágulo hansênico em um dado gerado no início desse projeto (Figura 4.17).

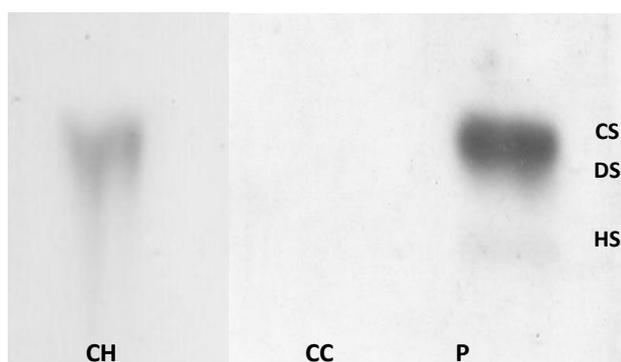


Figura 4.17: Eletroforese de Glicosaminoglicanos extraídos do coágulo hansênico e coágulo controle. CH: Coágulo Hansênico. CC: Coágulo controle. P: Padrão. CS, condroitin-sulfato; DS, dermatan sulfato, HS, heparan-sulfato. Aproximadamente 100mg de extrato seco e delipidado foi submetido a digestão com papaína. Todo o produto de digestão foi aplicado no gel de agarose e submetido à eletroforese.

Desse modo, para avaliar a presença de moléculas glicosiladas nas lesões de pacientes com hanseníase multibacilar em reação tipo II ou não reacionais, fragmentos de pele de aproximadamente seis milímetros (mm) obtidos por biópsia foram processados como descrito nos métodos e corados com PAS e Alcian-blue para a visualização de polissacarídeos neutros em magenta e polissacarídeos sulfatados em azul através de coloração em pH 1.0, respectivamente. Ambos os grupos de polissacarídeos são corados de azul através de coloração em pH 2,5 (Figura 4.18 e Figura 4.19).

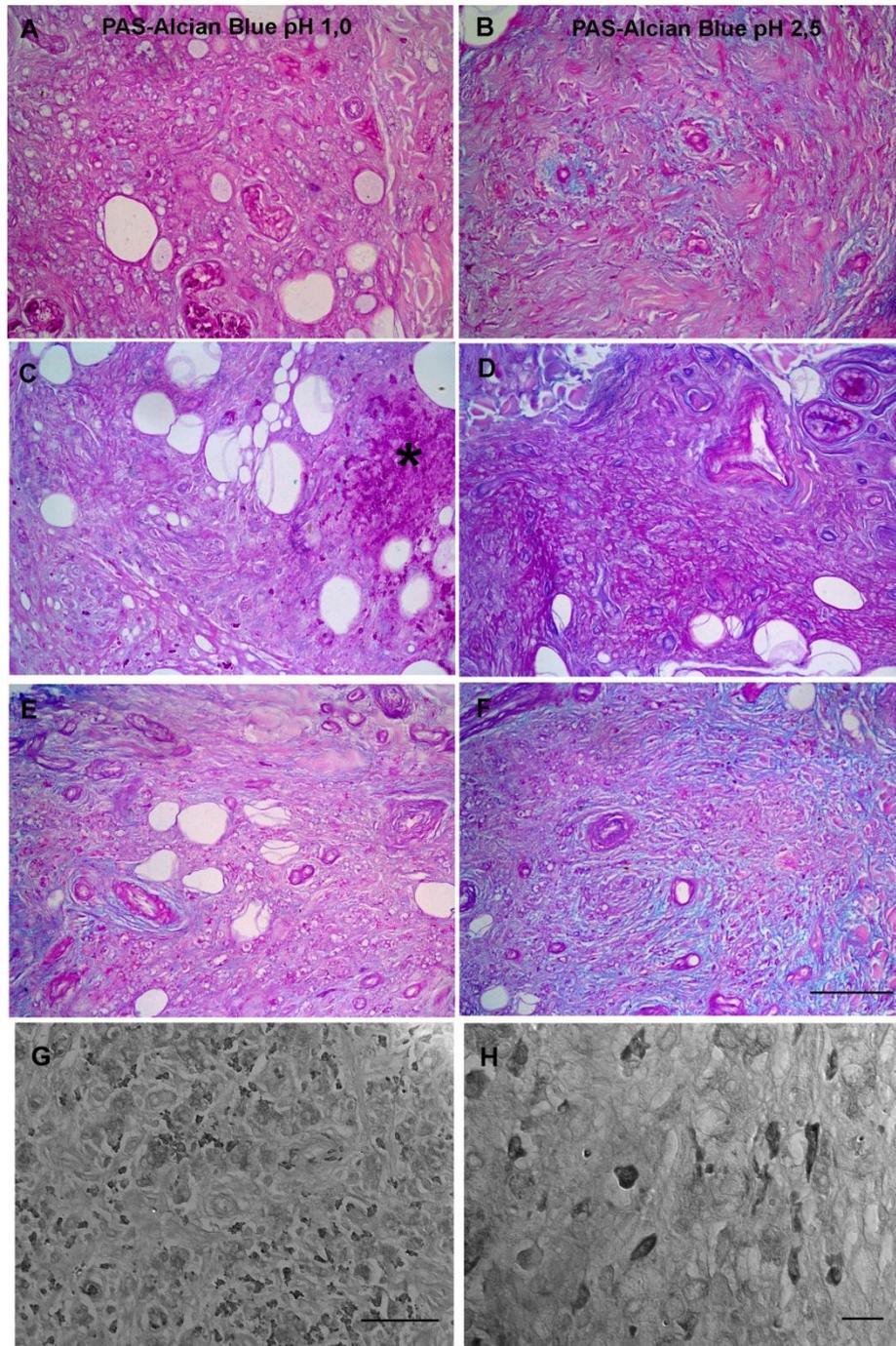


Figura 4.18: Histopatologia de lesão de pele de paciente multibacilar em reação tipo II. Seções foram coradas com ácido periódico (PAS) e *Alcian-blue* pH 1 (A, C,E,G) ou pH 2,5 (B,D,F,H). A-B: caso 27969, C-D/G-H: caso 28203, E-F: caso 28274. As setas e o asterístico apontam células com alto teor de polissacarídeos. Barra de escala representa 100 μ m em A,B,C,D,E e F; 50 μ m em G; 10 μ m em H. G e H representam região fortemente marcada pelo PAS (asterístico em C) vista em contraste interferencial de campo (DIC), onde é possível ver células de aspecto fusiforme apresentando grandes quantidades de polissacarídeos neutros.

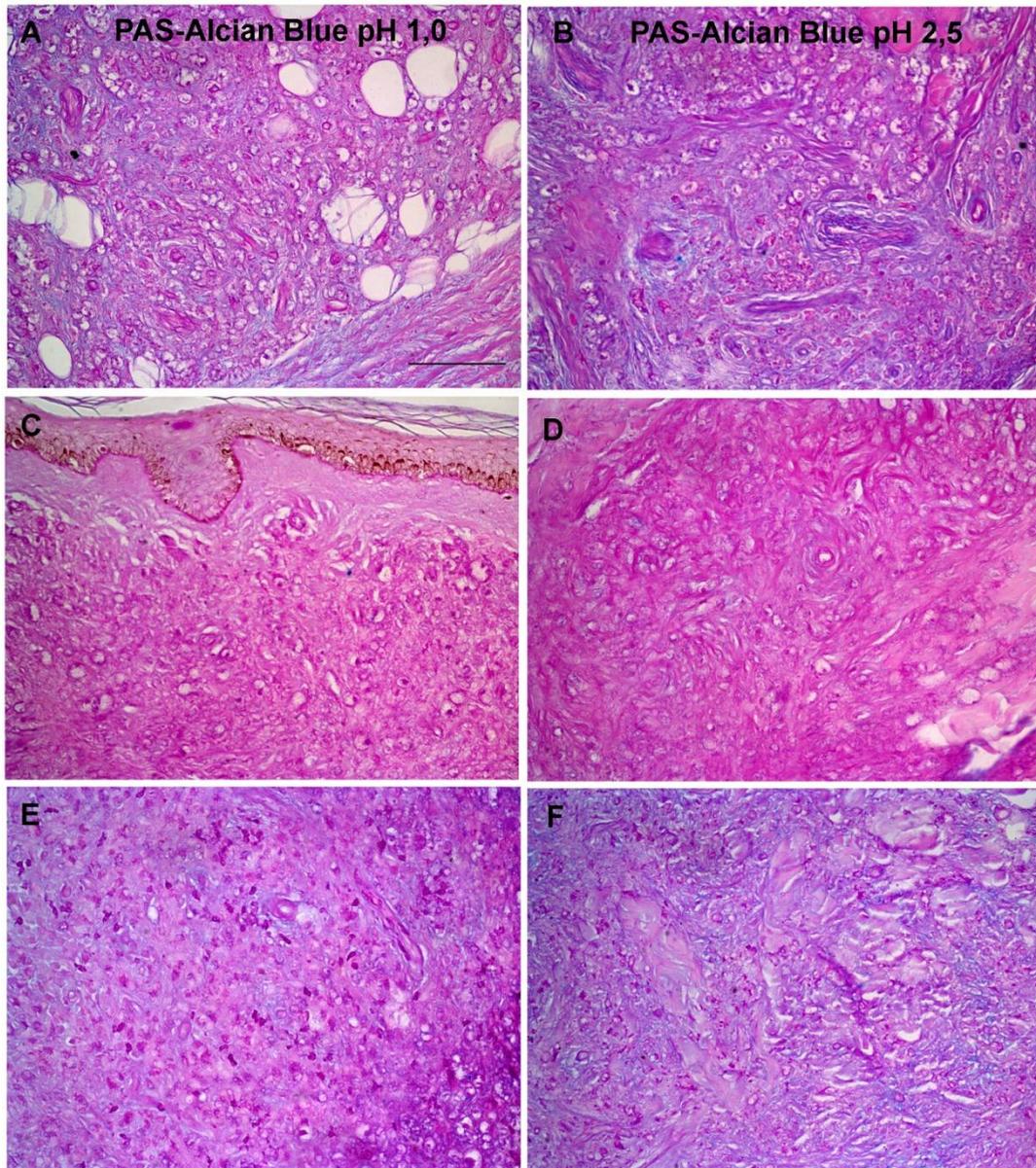


Figura 4.19: Histopatologia de lesão de pele de paciente multibacilar não reacional. Seções foram coradas com ácido periódico (PAS) e Alcian-blue pH 1 (A, C,E,G) ou pH 2,5 (B,D,F,H). A-B: caso 28029, C-D: caso 28030, E-F: caso: 28542.

A hanseníase ainda constitui relevante problema de saúde pública, a despeito da redução drástica no número de casos. De acordo com o Ministério da Saúde, os casos de hanseníase diminuíram 26% entre 2001 e 2011. No entanto, a queda da doença no resto do mundo foi muito mais acentuada, já que segundo a OMS em um período de seis anos (entre 2004 e 2010) houve uma redução de 40% nos casos da doença em todo o mundo.

Embora o impacto das ações no âmbito dessa endemia não ocorra em curto prazo, o Brasil reúne atualmente condições altamente favoráveis para a sua eliminação como problema de saúde pública, compromisso assumido pelo País em 1991 e que significa alcançar um coeficiente de prevalência de menos de um doente em cada 10 mil habitantes. Atualmente o Brasil apresenta 5 casos para cada 10 mil habitantes. A hanseníase quando diagnosticada e tratada tardiamente pode trazer graves consequências para os portadores, pelas lesões que os incapacitam fisicamente, e seus familiares, que ficam expostos mais tempo ao bacilo.

Como parte dos esforços das instituições de pesquisas mantidas pelo governo federal em entender as diferentes manifestações dessa doença, este estudo teve como propósito caracterizar uma massa anômala com aparência lipídica surgida no limiar entre o coágulo sanguíneo e soro de pacientes hansênicos do pólo lepromatoso, visando identificar possíveis distúrbios no metabolismo de lipídeos, na homeostase da coagulação, e o desenvolvimento de novas ferramentas para o diagnóstico precoce da doença e seus quadros reacionais.

Já se sabe que a resposta a infecções causadas por diversos patógenos como bactérias e fungos pode vir acompanhada por alterações nas principais vias metabólicas, podendo-se incluir o metabolismo de lipídeos e a cascata de coagulação.

Alguns estudos anteriores observaram algumas desordens na cascata de coagulação na hanseníase (Martinuzzo *et al*, 2002; Gupta *et al*, 1975; Wirawan *et al*, 1979). Embora altos níveis de plaquetas e marcadores de coagulação intravascular como Dímeros-D tenham sido descritos nesses estudos, existem poucos eventos trombóticos vasculares associados à hanseníase (Rogers, 1960).

A primeira parte do nosso trabalho então voltou-se a desvendar os componentes da massa anômala observada durante a coleta de soro de pacientes, utilizando-se técnicas proteômicas. A proteômica pode contribuir de modo

importante para o estudo de diversas doenças, aumentando a compreensão acerca de seus mecanismos moleculares e identificando novos biomarcadores para diagnóstico e prognóstico, assim como novos alvos terapêuticos, sendo amplamente utilizada nesta empreitada (Hanash 2003; Ray *et al* 2011).

Na parte inicial desse projeto, definimos o mapa proteômico dessa massa, identificando como proteínas mais abundantes cadeias α , β e γ de fibrinogênio e albumina, proteínas típicas de coágulo sanguíneo. Além dessas proteínas, também foram identificadas apoproteína AI e as proteínas de fase aguda haptoglobina e alfa-1-glicoproteína ácida, demonstrando que a massa anômala anteriormente identificada pelo apoio ambulatorial como “gordura” tratava-se de um coágulo formado de forma exacerbada, suplantando a população eritrocítica do sangue.

Devido à condição ímpar no surgimento desse coágulo na hanseníase e com a dificuldade de comparar esse evento com qualquer outra condição patológica, induzimos a formação de um coágulo pela titulação de cloreto de cálcio em plasma obtido de sangue de voluntários saudáveis. Notamos que esse coágulo induzido, embora de coloração mais clara, apresentava perfil proteico semelhante, com exceção de algumas bandas, ao coágulo hansênico (figura 4.2).

Na análise comparativa do perfil proteico de coágulos hansênicos e coágulo controles conseguimos encontrar 11 proteínas diferencialmente presentes, sendo que dessas, 3 foram identificadas somente no coágulo controle, 5 expressas somente no coágulo hansênico e 3 super expressas no coágulo controle em relação ao coágulo hansênico.

A apolipoproteína ApoA-I, o maior componente da lipoproteína HDL (*high density lipoprotein*) foi encontrada mais expressa no coágulo controle que no coágulo hansênico, o que corrobora com alguns dados presentes na literatura e os nossos (figura 4.12), que apontam o decréscimo de colesterol HDL na hanseníase (Mernon *et al* 1996; Gupta *et al* 2002). Apo AI / A-IV são associadas com a resposta da fase aguda e por promoverem efeitos anti-inflamatórios. Por exemplo, a Apo A-I suprime a ativação de neutrófilos e inibe a expressão endotelial de moléculas de aderência (Brouillette *et al* 2001). Kim e colaboradores (2007) mostraram a diminuição dos níveis de Apo AI no plasma em pacientes com HIV. A regulação de Apo A-I/A-IV no fígado parece ser inibida por IL-6 e TNF- α , arcsos de sinalização muito ativos na Hanseníase multibacilar e seus episódios reacionais (Navarro *et al* 2005).

Porém que fique claro que esse panorama sérico vai na contramão do observado nos tecidos infectados, onde foi demonstrado recentemente pelo nosso grupo a indução da síntese, captação e consequente acúmulo de colesterol e lipídeos em geral, além da formação de corpúsculos lipídicos nas células infectadas pelo *M. leprae*. Esse acúmulo se dá através da captação de apolipoproteínas séricas, resultando, ao que nossos dados indicam, na redução dos seus níveis sanguíneos (Matos *et al* 2012, Matos *et al*, dados não publicados).

Três proteínas do citoesqueleto foram encontradas diferencialmente expressas entre os coágulos hansênico e controle. São elas actina, encontrada super expressa no coágulo controle, tropomiosina, encontrada somente no coágulo controle e a β -tubulina, encontrada super expressa no coágulo hansênico. A actina é o maior componente dos filamentos finos das células musculares e do citoesqueleto de células não musculares e está presente em todos os eucariontes. A superfamília das tropomiosinas é considerada a mais prevalente fonte de alérgenos alimentares de origem animal enquanto que a β -tubulina, juntamente com a α -tubulina são as proteínas que compõem os microtúbulos. Essas proteínas provavelmente são provenientes das plaquetas arrastadas durante a formação do coágulo hansênico e da indução do coágulo controle

A fosfolipase A2 citosólica é uma enzima que catalisa a hidrólise das ligações ácido-éster de glicerofosfolipídios, liberando, como produto da catálise, ácidos graxos e lisofosfolipídios (Dennis *et al* 2011). Nesse estudo, observamos a supressão dessa enzima nas amostras de coágulo hansênico. A inibição da expressão de uma fosfolipase em decorrência da infecção pelo *M. leprae* já foi descrita na literatura (Tanigawa *et al* 2012), sendo reconhecido como um mecanismo da bactéria aumentar o acúmulo de lipídeos na célula hospedeira.

Por outro lado observamos também um incremento significativo na resposta sérica de IgM a cardiolipina em nossos pacientes (figura 4.14), um glicerofosfolipídio presente apenas na membrana interna mitocondrial. Dados da literatura demonstram a redução na expressão gênica mitocondrial durante a infecção pelo bacilo em questão (Guerreiro *et al* 2013). Dados ainda não publicados por nosso grupo parecem apontar para a redução drástica na atividade e presença de mitocôndrias durante a infecção pelo *M. leprae*. Acreditamos que uma possível autofagia mitocondrial associada à inibição de fosfolipases do hospedeiro podem resultar no acúmulo e reconhecimento imune de cardiolipina por parte do hospedeiro. Essa hipótese será analisada pormenorizadamente num futuro próximo.

O sistema complemento (SC) é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos. Está constituído por um conjunto de proteínas solúveis no plasma e expressas nas membranas celulares. O SC é ativado por diversos mecanismos através de duas vias: a clássica e a alternativa. As proteínas do SC são sintetizadas principalmente nos hepatócitos e macrófagos/monócitos (Iturry-Yamamoto & Portinho 2001). Na análise proteômica comparativa entre coágulo hansênico e coágulo controle, encontramos duas proteínas do sistema complemento mais expressas nos coágulos hansênicos em comparação aos controles: as proteínas C3 (envolvida na lise de patógenos através da via alternativa) e C4 (associada à via clássica envolvendo imunocomplexos com anticorpos), indicando que ambas as vias encontram-se aumentadas nesses indivíduos. De fato a exacerbação da atividade do sistema complemento já foi demonstrada em plasma de pacientes (Gomes *et al* 2008)

Devido ao fato de altos níveis de IgG e IgM terem sido identificados nos coágulos hansênicos (figura 4.1), acreditamos que provavelmente a proteína C4 esteja associada ao mesmo através de imunocomplexos.

Outra proteína encontrada somente no coágulo hansênico foi a proteína IHRP - *inter-alpha-trypsin inhibitor family heavy chain-related protein*. Esta glicoproteína já tem sido relacionada como tendo função anti-inflamatória, com a produção levemente aumentada em pacientes com doenças inflamatórias. Nessas situações a IHRP se liga a actina, impedindo a sua polimerização, suprimindo a fagocitose e a quimiotaxia de polimorfonucleares (Choi-Miura, 2004). Curiosamente a detecção da actina total também foi reduzida no coágulo hansênico. Não há dados na literatura sobre a regulação da IHRP sobre actina e ativação plaquetárias.

A haptoglobina é uma glicoproteína plasmática sintetizada principalmente pelo fígado com atividade antioxidante e imunomodulatória (Langlois e Delanghe, 1996). A principal função da haptoglobina é a formação de um complexo estável com a hemoglobina livre liberada no interior dos vasos sanguíneos prevenindo desta forma a excreção de ferro pelos rins e os danos causados pelo efeito oxidativo do ferro ao permanecer livre. Gupta e colaboradores (2007) em uma análise proteômica do soro de pacientes multibacilares em reação tipo II observou a expressão diferencial de isoformas de haptoglobina em pacientes ENH em relação a indivíduos saudáveis. Em nossas análises, encontramos uma isoforma de haptoglobina presente predominantemente nas amostras de coágulo hansênico, confirmando os dados da literatura.

Essas análises apontam para possíveis causas da formação do coágulo hansênico, podendo no futuro contribuir para o desenvolvimento de um diagnóstico sorológico pré-clínico para a doença.

Cerca de 35% dos pacientes que apresentaram o coágulo hansênico (12 pacientes) desenvolveram reação do tipo II (ENH), sendo que destes 2 eram virgens de tratamento na data da coleta do sangue, o que pode demonstrar não só uma relação entre o surgimento do coágulo hansênico e o estado reacional desses pacientes, como também a identificação de um parâmetro preditivo de reação.

Deste modo, na segunda parte do nosso trabalho, nos dedicamos avaliar as diferenças nos componentes da cascata de coagulação entre pacientes multibacilares não reacionais e pacientes que estavam desenvolvendo um quadro de reação tipo II, ambos virgens de tratamento.

O eritema nodoso hansênico é a síndrome inflamatória aguda que ocorre antes, durante ou após o tratamento da hanseníase multibacilar ou wirchowiana. O ENH é considerado importante causa de morbidade em meio aos pacientes com hanseníase, e, sem pronta assistência médica, pode ocasionar danos neurais, paralisias e deformidades. Atualmente, os episódios de ENH estão entre as principais causas de hospitalização desses pacientes em muitas regiões endêmicas brasileiras.

Em nossos resultados verificamos uma elevação considerável nos níveis de fibrinogênio nos pacientes com ENH em relação aos pacientes multibacilares não reacionais, resultados semelhante ao encontrado por Kurade e colaboradores (2001).

O sistema fibrinolítico é conhecido por desempenhar um papel importante na resposta inflamatória a infecções bacterianas (Sato *et al*, 2003). É sabido que em resposta a traumas vasculares, vias hemostáticas promovem a deposição de fibrina nos locais afetados (Mullarky, 2006). Esse processo se deve à exposição do plasma ao fator tecidual, ativando assim as vias de coagulação, o que culmina na ativação da protrombinase, enzima que converte protrombina em trombina, que por sua vez cliva o fibrinogênio, promovendo sua polimerização, deposição como fibrina e liberação de dímeros-D, pela degradação da fibrina já polimerizada. Observamos diferenças significativas nos níveis de dímero-D entre os pacientes multibacilares (em reação ou não) e os indivíduos saudáveis, indicando que indivíduos acometidos pela Hanseníase apresentam fibrinólise intravascular. Curiosamente, os níveis de fibrinogênio não se encontram diminuídos por consumo intravascular, pelo contrário,

encontram-se estatisticamente mais elevados em nossos pacientes quando comparados a indivíduos saudáveis, fato que pode indicar uma exacerbação da produção de fibrinogênio na Hanseníase.

Os anticorpos antifosfolípidios representam um grande grupo de imunoglobulinas de considerável importância clínica devido a sua associação com trombose venosa/arterial, já tendo sido observados em várias doenças, inclusive na hanseníase (Martinuzzo *et al* 2002; Sène *et al* 2002). De Larrañaga e colaboradores (2000) demonstraram a prevalência de anticorpos anticardiolipina e antiB2GP1 isotipo IgM nos pacientes de hanseníase. Em nossos dados identificamos um aumento na produção de anticorpos IgM anti-cardiolipina nos pacientes multibaciares que apresentaram o coágulo hansênico, no entanto, nos demais pacientes esse aumento foi apenas sugestivo, sem significância estatística.

Xie e colaboradores (2013) demonstraram o aumento da expressão de fator tecidual e TNF- α induzidos pelo complexo Anti- β 2GPI/ β 2GPI. Dados adicionais indicam que a inflamação e trombose estão ligadas em muitas condições clínicas. O TNF- α , citosina pró-inflamatória com forte ação pró-trombótica, estimula monócitos e a adesão de neutrófilos ao endotélio, prejudica a fibrinólise, inibe sistema antitrombótico da proteína C e aumenta a expressão de fator tecidual na superfície celular (Esmon 2008). Essa cascata de eventos foi registrada em nossos pacientes, sendo o TNF- α amplamente expresso nas reações hansênicas (Moraes *et al* 2001), talvez através da contribuição dos complexos imunes IgM-Cardiolipina, fato que contribuiria para o aumento do fator tecidual e aumento da coagulação intravascular e fibrinólise, como sugerido pelos altos níveis de D-dímeros observados nos pacientes.

A fase inicial do processo da coagulação ocorre quando células que expressam o fator tecidual em sua superfície são expostas aos componentes do sangue, sendo assim, este fator exerce um papel de suma importância nos processos de hemostasia. Nossos resultados demonstraram um aumento nos níveis de fator tecidual no soro de pacientes que apresentaram o coágulo hansênico, em relação ao soro colhido em data anterior. Porém esse aumento não ocorreu quando comparamos os níveis de fator tecidual no soro de pacientes multibaciares não reacionais e pacientes em ENH. Entretanto, ao analisar a expressão dessa molécula nas lesões de pele de pacientes em ENH notamos que estava aumentada nesse grupo de pacientes, em relação às lesões de pacientes não reacionais.

As metaloproteinases de matriz são muito importantes durante a infecção bacteriana pela ação direta nos componentes da matriz extracelular sobre a viabilidade, motilidade e adesão de patógenos. Teles e colaboradores (2010) observaram um aumento nos níveis de mRNA de MMP-9 e MMP-2 e de suas proteínas correspondentes, conjuntamente com o aumento dos níveis de expressão de TNF- α e IFN- γ nas lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide e em reação, também sendo correlacionada com destruição generalizada do tecido em pacientes com tuberculose. Não encontramos relação entre a atividade da MMP-9 e a formação do coágulo hansênico. Acreditamos que essa relação esteja ligada apenas aos episódios reacionais, onde a remodelação tecidual e subsequente liberação de componentes de matriz extracelular para a corrente sanguínea, fator não desprezível em pacientes que sofrem de infecção dérmica crônica e disseminada, pode favorecer a desestabilização da homeostase da coagulação, porém sem acarretar na formação do coágulo hansênico.

Em contrapartida, através da coloração de cortes de lesão por Alcian blue pH 2,5, observamos um aumento da expressão de glicosaminoglicanos (GAGs) não sulfatados nas lesões dos pacientes multibacilares em reação tipo II em relação aos pacientes multibacilares, porém não observamos diferença na expressão de GAGs sulfatados.

Os Glicosaminoglicanos são moléculas encontradas ubiquamente no corpo humano, sendo integrantes importantes da matriz extracelular. Moléculas de GAG são expressas na superfície de muitas células eucarióticas e medeiam muitos processos celulares. (Wadstrom & Ljungh, 1990). Os principais glicosaminoglicanos são: condroitim 4 e 6 sulfato (CS), dermatam sulfato (DS), heparan sulfato (HS), heparina (HEP), queratam sulfato (QS) e ácido hialurônico (AH). Estes compostos diferem entre si quanto ao tipo de hexosamina e açúcar não aminado, quanto ao grau e posição de sulfatação. Com exceção do ácido hialurônico, todos os glicosaminoglicanos estão ligados covalentemente a esqueleto proteico, formando assim os proteoglicanos. Estão envolvidos em múltiplas funções biológicas como adesão, migração e proliferação celular, secreção de proteínas e expressão gênica. De forma geral, os GAGs contribuem para a estrutura e as propriedades de permeabilidade do tecido conjuntivo, bem como guia para enzimas e fatores de crescimento tanto na matriz quanto na superfície das células (Cechowska-Pasko et al 1996; Frase et al 1997).

Alguns estudos já demonstraram o aumento da presença de mucopolissacarídeos (nome dado anteriormente aos glicosaminoglicanos) em lesões de pele de pacientes com hanseníase (Abolos *et al* 1974; Skinsnes & Matsuo 1974). Segundo Jiang e colaboradores (2007), a produção de citocinas inflamatórias por monócitos pode também ser induzida por produtos de degradação do ácido hialurônico através da estimulação dos receptores Toll-like (TLR2 e TLR4). Altos níveis de RNAm de citocinas pró-inflamatórias com TNF- α , IL-6 e IL-12 foram detectados na derme, assim como na epiderme durante os episódios reacionais (RR ou ENH) (Moraes *et al* 2000; Moraes *et al* 2001; Teles *et al* 2002).

Acreditamos que a alta carga bacilar nesses indivíduos, e a resposta imune à mesma, podem acarretar na liberação de moléculas com alto poder trombogênico na corrente sanguínea. A presença dessas moléculas poderia favorecer a ativação da cascata de coagulação. A definição de um estado de hipercoagulabilidade na hanseníase, caracterizados aqui pelo aumento da expressão de fator tecidual, fibrinogênio e dímero-D no soro dos nossos pacientes, nos leva a pensar em uma pré-disposição a eventos trombogênicos, até então ditos não frequentes na hanseníase. Todavia é necessário ressaltar a heterogeneidade das respostas encontradas, demonstrando a necessidade de se expandir o grupo de indivíduos estudados.

Na figura 5.20 pode ser encontrado o modelo esquemático das alterações de coagulação observadas na hanseníase, com base nos resultados desse estudo.

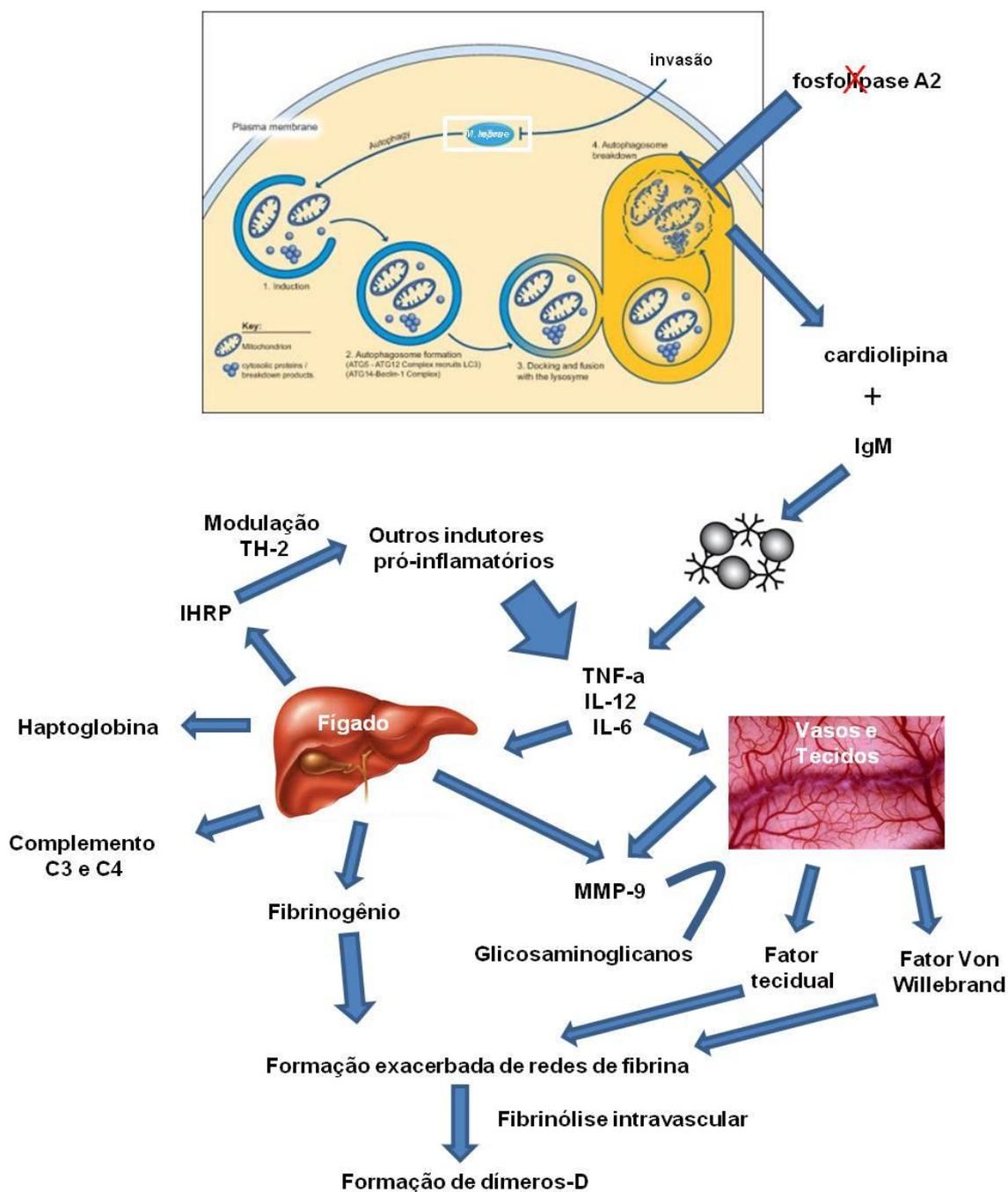


Figura 5.20: Proposta mecânica das alterações de coagulação observadas na Hanseníase. A infecção pelo *M. leprae* é capaz de induzir a formação de complexos imunes contendo a cardiolipina proveniente das mitocôndrias afetadas após a infecção, ao mesmo tempo em que inibe a função da fosfolipase A2. Os complexos imunes são capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias que atuam no fígado, aumentando a expressão de fibrinogênio, proteínas de fase aguda e componentes do complemento, do mesmo modo como induzem a produção de fatores de coagulação no endotélio. Todos esses fatores liberados na corrente sanguínea contribuem para formação da rede de fibrina, gerando assim o potencial trombótico que pode culminar na formação do coágulo hansênico e nas alterações gerais de coagulação observadas neste estudo.

A partir dos resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- Para este grupo amostral, a formação do coágulo hansênico não possui valor preditivo para o diagnóstico precoce da reação hansênica tipo II. Embora seja um evento relatado frequentemente, sua ocorrência e composição necessitam ser estudadas em outros grupos populacionais;
- O aumento dos fatores tecidual e de von Willebrand no soro de pacientes hansênicos colhido na data de aparecimento do coágulo, em relação ao colhido em data anterior, indicam um estado de hipercoagulabilidade, com pré-disposição a eventos trombotogênicos;
- O aumento dos níveis de fibrinogênio e dímero-D em pacientes em reação apontam para um desbalanço da cascata de coagulação.
- Pacientes multibacilares em reação tipo II expressam mais glicosaminoglicanos não sulfatados em relação aos pacientes multibacilares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abalos RM, Tolentino JG, Bustillo CC. Histochemical study of Erythema nodosum leprosum (ENL) lesions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1974 Oct-Dec;42(4):385-91.

Andersson JO, Andersson SG. Pseudogenes, junk DNA, and the dynamics of *Rickettsia* genomes. *Mol Biol Evol.* 2001 May;18(5):829-39.

Antunes SL, Gallo ME, de Almeida SM, Mota E, Pelajo M, Lenzi HL. Dermal extracellular matrix in cutaneous leprosy lesions. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1999 Mar;67(1):24-35.

Araujo, M.G. Hanseníase no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2003. 36(3):373-382, mai-jun.

Baptista I M F D e Opromolla D V A. Micobactérias. In: *Noções de Hansenologia*. Bauru: Centro de Estudos Dr.Reynaldo Quagliato, 2000.

Bevilacqua MP, Pober JS, Mendrick DL, Cotran RS, Gimbrone MA. Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84: 9238-42.

Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 1959 Aug;37(8):911-7

Bloom BR, Godal T. Selective primary health care: strategies for control of disease in the developing world. V. Leprosy. *Rev Infect Dis.* 1983 Jul-Aug;5(4):765-80

Bonfa E, Llovet R, Scheinberg M, de Souza JM, Elkon KB. Comparison between autoantibodies in malaria and leprosy with lupus. *Clin Exp Immunol.* 1987 Dec;70(3):529-37.

Brouillette, C. G.; Anantharamaiah, G. M.; Engler, J. A.; Borhani, D. W. Structural models of human apolipoprotein A-I: a critical analysis and review. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1531, 4–46.

Cechowska-Pasko M, Palka J, Bankowski E. Decreased in glycosaminoglycans content in the skin of diabetic rats: the role of IGI-I, IGF-binding proteins and proteolytic activity. *Mol Cell Biochem.* 1996;154:1-8.

Chavez-Legaspi M, Gomez-Vazquez A, García-De La Torre I. Study of rheumatic manifestations and serologic abnormalities in patients with lepromatous leprosy. *J Rheumatol.* 1985 Aug;12(4):738-41.

Choi-Miura NH. Novel human plasma proteins, IHRP (acute phase protein) and PHBP (serine protease), which bind to glycosaminoglycans. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents.* 2004 Jul;2(3):239-48.

Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998 Jun 11;393(6685):537-44.

Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR et al. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature.* 2001 Feb 22;409(6823):1007-11

Cotran RS. New role for the endothelium in inflammation and immunity. *Am J Pathol* 1987;129: 407-13.

Davie EW, Ratnoff OD. Waterfall Sequence For Intrinsic Blood Clotting. *Science.* 1964 Sep 18;145(3638):1310-2

Dennis EA, Cao J, Hsu YH, Magrioti V, Kokotos G. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev.* 2011 Oct 12;111(10):6130-85.

De Larrañaga GF, Forastiero RR, Martinuzzo ME, Carreras LO, Tsariktsian G, Sturno MM, Alonso BS. High prevalence of antiphospholipid antibodies in leprosy: evaluation of antigen reactivity. *Lupus.* 2000;9(8):594-600.

Dikshit B, Wanchu A, Sachdeva RK, Sharma A, Das R. Profile of hematological abnormalities of Indian HIV infected individuals. *BMC Blood Disord.* 2009 Aug 13;9:5.

Elbeialy,A.; Hughes, G.R.V. Antiphospholipid antibodies in leprotic patients: A correlation with disease Manifestations. *Clinical and Experimental Rheumatology*; 18: 492-494. 2000.

Elkington PT, D'Armiento JM, Friedland JS. Tuberculosis immunopathology: the neglected role of extracellular matrix destruction. *Sci Transl Med*. 2011 Feb 23;3(71):71ps6.

Esmon CT. The impact of the inflammatory response on coagulation. *Thromb Res*. 2004;114(5-6):321-7. Review. PubMed PMID: 15507261.

Fleury, R.N. Hanseníase Visceral – Patogênese. *Hansen. Int. Special. Congresso*, 67-71, 1998.

Foss, N.T. Souza CS, Goulart IMB, Gonçalves HS, Virmond M . Hanseníase: Episódios Reacionais. Sociedade Brasileira de Hansenologia e Sociedade Brasileira de Dermatologia. In: Projeto Diretrizes. v. III, São Paulo, Brasília, 2005, Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina, p. 161-179. Disponível em <http://www.amb.org.br>.

Francischetti IM, Seydel KB, Monteiro RQ. Blood coagulation, inflammation, and malaria. *Microcirculation*. 2008 Feb;15(2):81-107. doi: 10.1080/10739680701451516. Review.

Fraser JRE, Laurent TC, Laurent UBG. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med*. 1997;242:27-33.

Freitas, T.C.; Fleury, R.N. Perfil Hematológico De Pacientes De Hanseníase Com Episódios Reacionais De Eritema Nodoso, *Hansen. Int.*, 21(1): 52-57, 1998

Fujita M, Kunitake R, Nagano Y, Maeda F. Disseminated intravascular coagulation associated with pulmonary tuberculosis. *Intern Med*. 1997. Mar;36(3):218-20.

Godal T, Lofgren M, Negassi K. Immune response to *M. leprae* of healthy leprosy contacts. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis*. 1972 Set;40(3):243-250

Gomes GI, Nahn EP Jr, Santos RK, Da Silva WD, Kipnis TL. The functional state of the complement system in leprosy. *Am J Trop Med Hyg.* 2008 Apr;78(4):605-10.

Guerreiro LT, Robottom-Ferreira AB, Ribeiro-Alves M, Toledo-Pinto TG, Rosa Brito T, Rosa PS, et al. Gene expression profiling specifies chemokine, mitochondrial and lipid metabolism signatures in leprosy. *PLoS One.* 2013 Jun 14;8(6)

Görg, A.; Weiss, W.; Dunn, MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics.* Dec;4(12):3665-85, 2004

Gupta, M., Bhargava, M., Kumar, S.; Mittal, M.M. Platelet function in leprosy. *International Journal of Leprosy,* v43, n4, p327-332, 1975.

Gupta A, Koranne RV, Kaul N. Study of serum lipids in leprosy. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2002 Sep-Oct;68(5):262-6.

Gupta N, Shankernarayan NP, Dharmalingam K. Serum proteome of leprosy patients undergoing erythema nodosum leprosum reaction: regulation of expression of the isoforms of haptoglobin. *J Proteome Res.* 2007 Sep;6(9):3669-79.

Gupta N, Shankernarayan NP, Dharmalingam K. Alpha1-acid glycoprotein as a putative biomarker for monitoring the development of the type II reactional stage of leprosy. *J Med Microbiol.* 2010 Apr;59(Pt 4):400-7

Hanash S. Disease proteomics. *Nature.* 2003 Mar 13;422(6928):226-32.

Hunninghake GW, Davidson JM, Rennard S, Szapiel S, Gadek JE, Crystal RG. Elastin fragments attract macrophage precursors to diseased sites in pulmonary emphysema. *Science.* 1981 May 22;212(4497):925-7.

Ignotti, E P R. Situação epidemiológica da hanseníase no Brasil: Análise de indicadores selecionados no período de 2001 a 2010. *Secr Vigilância Em Saúde Ministério Saude.* 2010. p. 185–201.

Imai K, Hiramatsu A, Fukushima D, Pierschbacher MD, Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites, kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem J.* 1997. Mar 15;322 (Pt 3):809-14.

Ito A, Mukaiyama A, Itoh Y, Nagase H, Thogersen IB, Enghild JJ, Sasaguri Y, Mori Y. Degradation of interleukin 1beta by matrix metalloproteinases. *J Biol Chem.* 1996 Jun 21;271(25):14657-60.

Iturry-Yamamoto GR; Portinho CP. Sistema Complemento: Ativação, Regulação E Deficiências Congênitas E Adquiridas. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 2001 Jan./Mar 47(1) São Paulo .

Jennewein C, Tran N, Paulus P, Ellinghaus P, Eble JA, Zacharowski K. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Mol Med.* 2011 May-Jun;17(5-6):568-73.

Jiang D, Liang J, Noble PW. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23:435–461

Jih MH, Kimyai-Asadi A, Levis WR. Reversal reaction to Hansen's disease. *J Drugs Dermatol.* 2002 Jul;1(1):70-71.

Job, C.K. et al. New findings in the mode of entry of *Mycobacterium leprae* in nude mice. *Int. J. Leprosy*, v.58, p. 726-29, 1990.

Jopling, W.H. *Manual de Lepra.* Atheneu Ed, p154, Rio de Janeiro 1983

Jopling RH, Mc Dougall AC. A doença. In: *Manual de hanseníase.* 4th ed. São Paulo: Atheneu Editora; 1991.p.11-59.

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

Katoch VM. Molecular techniques for leprosy: present applications and future perspectives. *Indian J Lepr.* 1999 Mar;71(1):45–59.

Kim, S. S.; Kim, M. H.; Shin, B. K.; Na, H. J.; Choi, J. Y.; Kee, M. K.; Chong, S. A.; Nam, M. J. Different isoforms of apolipoprotein AI present heterologous post-translational expression in HIV infected patients. *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 180–184.

Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasyus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1971 Jul-Sep;39(3):693-702.

Korpos E, Wu C, Sorokin L. Multiple roles of the extracellular matrix in inflammation. *Curr Pharm Des.* 2009;15(12):1349-57.

Kothari H, Rao LV, Vankayalapati R, Pendurthi UR. Mycobacterium tuberculosis infection and tissue factor expression in macrophages. *PLoS One.* 2012;7(9)

Kurade N, Dhamanaskar PK, Jadhav VH, Jadhav MV. Protein profile in leprosy. *Indian J Med Sci.* 2001 Jun;55(6):319-25.

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5.

Lahiri R, Randhawa B, Krahenbuhl J. Application of a viability-staining method for *Mycobacterium leprae* derived from the athymic (nu/nu) mouse foot pad. *J Med Microbiol.* 2005 Mar;54(Pt 3):235–42.

Langer B, Wolosker, M. Coagulação e fibrinólise: ideias atuais e suas aplicações clínicas. *Rev Med (São Paulo).* 2006 out.-dez.;85(4) edição comemorativa:157-64.

Langlois M, Delanghe J, De Buyzere M. Relation between serum IgA concentration and haptoglobin type. *Clin Chem.* 1996 Oct;42(10):1722-3.

Lee DJ, Li H, Ochoa MT, Tanaka M, Carbone RJ, Damoiseaux R, Burdick A, Sarno EN, Rea TH, Modlin RL. Integrated pathways for neutrophil recruitment and inflammation in leprosy. *J Infect Dis.* 2010 Feb 15;201(4):558-69

Lefkowitz JB. Coagulation pathway and physiology. In: Kottke-Marchant K, ed. *An Algorithmic Approach to Hemostasis Testing.* Northfield, IL: College of American Pathologists; 2008:3-12.

Levi M, Keller TT, van Gorp E, ten Cate H. Infection and inflammation and the coagulation system. *Cardiovasc Res.* 2003 Oct 15;60(1):26-39

Louzada JR. P, Simon S M, Voltarelli J C, Donadi E A. Síndrome do anticorpo antifosfolípide. *Medicina, Ribeirão Preto,* 31: 305-315, abr./jun, 1998.

Love PE, Santoro SA. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Prevalence and clinical significance. *Ann Intern Med.* 1990 May 1;112(9):682-98.

Macfarlane RG, biggs R, Ash BJ, Denson KW. The Interaction Of Factors 8 And 9. *Br J Haematol.* 1964 Oct;10:530-41.

Madeira S e Rosa PS. Hanseníase Experimental. In: *Noções de Hansenologia.* Bauru: Centro de Estudos Dr.Reynaldo Quagliato, 2000.

Manandhar R, LeMaster JW, Roche PW. Risk factors for erythema nodosum leprosum. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 1999 Sep;67(3):270-278.

McMillen MA, Huribal M, Sumpio B. Common pathway of endothelial-leukocyte interaction in shock, ischemia, and reperfusion. *Am J Surg* 1993;166: 557-62

Mark PL, Ashok PP, Deshpande RB, Mahashur AA. A patient with hypercoagulable state due to tuberculosis. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* 2009 Jan-Mar;51(1):49-51

Martinuzzo ME, de Larrañaga GF, Forastiero RR, Pelegri Y, Fariña MH, Alonso BS, Kordich LC, Carreras LO. Markers of platelet, endothelial cell and blood coagulation activation in leprosy patients with antiphospholipid antibodies. *Clin Exp Rheumatol*. 2002 Jul-Aug;20(4):477-83.

Mattos KA, Sarno EN, Pessolani MC, Bozza PT. Deciphering the contribution of lipid droplets in leprosy: multifunctional organelles with roles in *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Dec;107 Suppl 1:156-66.

Medina F, Camargo A, Moreno J, Zonana-Nacach A, Aceves-Avila J, Fraga A. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies in leprosy. *Br J Rheumatol*. 1998 Mar;37(3):270-3

Mernon RA, Hussain R, Raynes JG, Lateff A, Chiang TJ. Alterations in serum lipids in lepromatous leprosy patients with and without ENL reactions and their relationship to acute phase proteins. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*. 1996 Jun;64(2):115-22.

Miller RA, Wener MH, Harnisch JP, Gilliland BC. The limited spectrum of antinuclear antibodies in leprosy. *J Rheumatol*. 1987 Feb;14(1):108-10.

Myrvang, B.; Godal, T.; Ridley, D.; Froland, S.; Song, Y. Immune responsiveness to *Mycobacterium leprae* and other mycobacterial antigens throughout the clinical and histopathological spectrum of leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, v.14, p.541-53, 1973.

Monot M, Honoré N, Garnier T, Araoz R, Coppée JY, Lacroix C, et al. On the origin of leprosy. *Science*. 2005 May 13;308(5724):1040-2.

Monteiro R, Abreu MA, Tiezzi MG, Roncada EV, Oliveira CC, Ortigosa LC. Lucio's phenomenon: another case reported in Brazil. *An Bras Dermatol*. 2012 Mar-Apr;87(2):296-300.

Moraes MO, Sampaio EP, Nery JA, Saraiva BC, Alvarenga FB, Sarno EN. Sequential erythema nodosum leprosum and reversal reaction with similar lesional cytokine mRNA patterns in a borderline leprosy patient. *Br J Dermatol*. 2001 Jan;144(1):175-81.

Moraes MO, Sarno EN, Teles RM, Almeida AS, Saraiva BC, Nery JA, Sampaio EP. Anti-inflammatory drugs block cytokine mRNA accumulation in the skin and improve the clinical condition of reactional leprosy patients. *J Invest Dermatol.* 2000 Dec;115(6):935-41.

Mullarky, IK. et al. In situ assays demonstrate that interferon-gamma suppresses infection-stimulated hepatic fibrin deposition by promoting fibrinolysis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 4: 1580–1587, 2006.

Navarro, M. A.; Carpintero, R.; Acin, S.; Arbones-Mainar, J. M.; Calleja, L.; Carnicer, R.; Surra, J. C.; Guzman-Garcia, M. A.; Gonzalez-Ramon, N.; Iturralde, M.; Lampreave, F.; Pineiro, A.; Osada, J. Immune-regulation of the apolipoprotein A-I/C-III/AIV gene cluster in experimental inflammation. *Cytokine* 2005, 31, 52–63.

Ng V, Zanazzi G, Timpl R, Talts JF, Salzer JL, Brennan PJ, Rambukkana A. Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*. *Cell.* 2000 Oct 27;103(3):511-24.

Paina FA, Queiroz RH, Souza AM. [Hematological, hemostatic and biochemical alterations induced by clofazimine and clarithromycin, in single and multiple doses, in rats. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008 May-Jun;41(3):282-7.

Pappelbaum KI, Gorzelanny C, Grässle S, Suckau J, Laschke MW, Bischoff M, Bauer C, Schorpp-Kistner M, Weidenmaier C, Schneppenheim R, Obser T, Sinha B, Schneider SW. Ultralarge von Willebrand factor fibers mediate luminal *Staphylococcus aureus* adhesion to an intact endothelial cell layer under shear stress. *Circulation.* 2013 Jul 2;128(1):50-9

Parvez M, Sharda DP, Jain AK, Bhargava NC, Misra SN. A study of platelet adhesiveness in leprosy. *Lepr India.* 1979 Jul;51(3):363-8.

Pocaterra L, Jain S, Reddy R, Muzaffarullah S, Torres O, Suneetha S, et al. Clinical course of erythema nodosum leprosum: an 11-year cohort study in Hyderabad, India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2006 Maio;74(5):868-879.

Ray, S et al. Proteomic technologies for the identification of disease biomarkers in serum: Advances and challenges ahead. *Proteomics*, 11, 2139-2161, 2011.

Rees RJ. LEPRA's elective period student programme, 1973-1983. *Lepr Rev.* 1985 Dez;55(4):321-325.

Ribeiro SL, Pereira HL, Silva NP, Souza AW, Sato EI. Anti- β 2-glycoprotein I antibodies are highly prevalent in a large number of Brazilian leprosy patients. *Acta Reumatol Port.* 2011 Jan-Mar;36(1):30-7

Riddel JP Jr, Aouizerat BE, Miaskowski C, Lillicrap DP. Theories of blood coagulation. *J Pediatr Oncol Nurs.* 2007 May-Jun;24(3):123-31. Review.

Ridley D; Jopling W. Classification of leprosy according to immunity. A fivegroup system. *Int. J. Lepr.*, v.34, p.255-73, 1966

Rogers,JH. Coronary Thrombosis, Cerebral Vascular Accident And Pulmonary Embolism In Leprosy. *Ann Intern Med.* 53:746-53, 1960

Salluh JI, Rabello LS, Rosolem MM, Soares M, Bozza FA, Verdeal JC, Mello GW, Castro Faria Neto HC, Lapa E Silva JR, Bozza PT. The impact of coagulation parameters on the outcomes of patients with severe community-acquired pneumonia requiring intensive care unit admission. *J Crit Care.* 2011 Oct;26(5):496-501.

Sato, J.; Schorey, J.; Ploplis, V.A.; Haalboom,E.; Krahule, ,L. Castellino, F.J. The Fibrinolytic System in Dissemination and Matrix Protein Deposition During a Mycobacterium Infection. *American Journal of Pathology*, Vol. 163, No. 2, August 2003

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

Secretaria de vigilância em saúde-Ministério da Saúde. 2011.

Sène D, Piette JC, Cacoub P. Antiphospholipid antibodies, antiphospholipid syndrome and infections. *Autoimmun Rev.* 2008 Feb;7(4):272-7.

Shepard Cc. The Experimental Disease That Follows The Injection Of Human Leprosy Bacilli Into Foot-Pads Of Mice. *J Exp Med.* 1965 Sep 1;112(3):445–54

Shitrit D, Izbicki G, Shitrit AB, Kramer MR, Rudensky B, Sulkes J, Hersch M. Prognostic value of a new quantitative D-dimer test in critically ill patients 24 and 48 h following admission to the intensive care unit. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2004 Jan;15(1):15-9.

Skinsnes OK, Matsuo E. Acid mucopolysaccharide metabolism in leprosy. 1. Storage of hyaluronic acid and its possible significance in the pathogenesis of leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1974 Oct-Dec;42(4):392-8

Spencer JS, Duthie MS, Geluk A, Balagon MF, Kim HJ, Wheat WH et al. Identification of serological biomarkers of infection, disease progression and treatment efficacy for leprosy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2012 Dec;107 Suppl 1:79-89

Tanne D, Katzav A, Beilin O, Grigoriadis NC, Blank M, Pick CG, Landenberg Pv, Shoenfeld Y, Chapman J. Interaction of inflammation, thrombosis, aspirin and enoxaparin in CNS experimental antiphospholipid syndrome. *Neurobiol Dis.* 2008. Apr;30(1):56-64.

Tanigawa K, Degang Y, Kawashima A, Akama T, Yoshihara A, Ishido Y, Makino M, Ishii N, Suzuki K. Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Microb Pathog.* 2012 May;52(5):285-91.

Teles RM, Moraes MO, Geraldo NT, Salles AM, Sarno EN, Sampaio EP. Differential TNFalpha mRNA regulation detected in the epidermis of leprosy patients. *Arch Dermatol Res.* 2002 Nov;294(8):355-62.

Teles RM, Teles RB, Amadeu TP, Moura DF, Mendonça-Lima L, Ferreira H, Santos IM, Nery JA, Sarno EN, Sampaio EP. High matrix metalloproteinase production

correlates with immune activation and leukocyte migration in leprosy reactional lesions. *Infect Immun*. 2010 Mar;78(3):1012-21.

Terra, P. Coagulação. *Interpretação Clínica dos Testes Laboratoriais de Rotina*. Ed Atheneu. 2004. 3ª edição: 7-16. São Paulo.

Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. *Int J Lepr Mycobact Dis Off Organ Int Lepr Assoc*. 2001 Mar;69(1):1–12.

Truman RW, Singh P, Sharma R, Busso P, Rougemont J, Paniz-Mondolfi A, Kapopoulou A, Brisse S, Scollard DM, Gillis TP, Cole ST. Probable zoonotic leprosy in the southern United States. *N Engl J Med*. 2011 Apr 28;364(17):1626-33.

Ustianowski AP, Lockwood DN. Leprosy: current diagnostic and treatment approaches. *Curr Opin Infect Dis*. 2003 Oct;16(5):421-7.

Van Brakel WH, Khawas IB, Lucas SB. Reactions in leprosy: an epidemiological study of 386 patients in west Nepal. *Lepr Rev*. 1994 Sep;65(3):190-203.

Van der Poll T, de Boer JD, Levi M. The effect of inflammation on coagulation and vice versa. *Curr Opin Infect Dis*. 2011 Jun;24(3):273-8.

Vargas-Ocampo F. Diffuse leprosy of Lucio and Latapí: a histologic study. *Lepr Rev*. 2007 Sep;78(3):248-60

Vissa, D.V. & Brennan, P.J. Impact of the *Mycobacterium leprae* genome sequence on leprosy research. In: *Genomics of rich Gram-positive bacteria*. pp. 85-117. Caister Academic Press, Wymondham, U. K, 2002

Wadström T, Ljungh A. Glycosaminoglycan-binding microbial proteins in tissue adhesion and invasion: key events in microbial pathogenicity. *J Med Microbiol*. 1999 Mar;48(3):223-33.

Walker SL, Lockwood DN. Leprosy. *Clin Dermatol*. 2007 Mar-Apr;25(2):165-72

Walker SL, Waters MFR, Lockwood DNJ. The role of thalidomide in the management of erythema nodosum leprosum. *Lepr Rev.* 2007 Sep;78(3):197-215.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *J Biol Chem.* 1996 Apr 26;271(17):10079-86.

Wirawan R, Sardi F, Latu J, Wirjadi B. Investigation of coagulation abnormalities in patients with erythema nodosum leprosum. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1979 Sep;10(3):393-7

WHO, 1987. *Laboratory techniques for leprosy.* p.62

Xie H, Zhou H, Wang H, Chen D, Xia L, Wang T, Yan J. Anti- $\beta(2)$ GPI/ $\beta(2)$ GPI induced TF and TNF- α expression in monocytes involving both TLR4/MyD88 and TLR4/TRIF signaling pathways. *Mol Immunol.* 2013 Mar;53(3):246-54.