

Purificação de neutrófilos circulantes de sangue periférico de pacientes com hanseníase atendidos no Ambulatório Souza Araújo, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro



Brenda Ficheira Coelho Ribeiro; Colégio Pedro II- campus Niterói
Rafaela de Souza Andrade: Colégio Pedro II- campus Niterói
Orientadora: Verônica Schmitz Pereira
Co-orientadora: Isabella Forasteiro Tavares
Instituto Oswaldo Cruz- Laboratório de Hanseníase



Introdução

A hanseníase é uma doença infecciosa causada pelo *Mycobacterium leprae*, que afeta principalmente a pele e os nervos periféricos. Os sintomas mais recorrentes são lesões de pele com alteração de sensibilidade na área afetada¹. Os pacientes podem apresentar diversas formas clínicas e no Ambulatório Souza Araújo, onde esse trabalho foi desenvolvido, é adotada a escala de Ridley e Jopling que baseia-se nos aspectos clínicos, bacteriológicos, imunológicos e histopatológicos. Dessa forma os pacientes podem apresentar hanseníase na forma de espectro com dois polos distintos e bem definidos: hanseníase tuberculóide (TT) ou lepromatosa (LL). Entre pólos encontram-se as formas borderlines consideradas imunologicamente instáveis: BT (borderline tuberculóide), BB (borderline boderline), BL (borderline lepromatoso)². Apesar desses espectros, é comum alguns pacientes desenvolverem reações agudas inflamatórias a qualquer momento, inclusive antes, durante ou após a poliquimioterapia. As principais reações são: ENH (eritema nodoso hansênico) e RR (reação reversa). Vale ressaltar que nas lesões dos pacientes com ENH, a presença de neutrófilos é considerada um marco histológico³.

O Brasil é o segundo país em número de novos casos de hanseníase. Entretanto, ainda hoje a hanseníase é uma doença negligenciada no cenário brasileiro⁴. No entanto, apesar de ainda ser uma doença estigmatizante, há cura, e o acesso à informação e ao tratamento gratuito significam um grande avanço para romper as barreiras do preconceito e erradicar a doença.

Os neutrófilos são células leucocitárias circulantes do sistema imune inato pertencentes à classe dos granulócitos. Apresentam grânulos no citoplasma e núcleo segmentado. Esses grânulos são divididos em 3 tipos e contêm diversas proteínas antimicrobianas. São os leucócitos que estão em maior quantidade no sangue (até 70%)⁵. Apesar de não serem muito explorados em estudos relacionados à hanseníase, trabalhos do nosso grupo sugerem que os neutrófilos têm papel fundamental no desenvolvimento e agravamento da doença em determinados casos³. Por isso, em nosso laboratório, estudamos a ligação dos neutrófilos com a imunopatogênese da hanseníase.



O neutrófilo jovem, que ainda não chegou em sua fase madura, apresenta o núcleo em formato de bastonete. O neutrófilo já maduro tem seu núcleo segmentado, com 2 a 5 lóbulos. Adaptado de Pillay et al., 2013. Cell. Mol. Life Sci. (2013) 70:3813–3827

Montagem de lâmina por citospyn - Após o processamento do sangue por Ficoll, as células foram colocadas em lâminas, e centrifugadas à 600 xg por 6 minutos no citospyn, uma centrífuga para citologia. Depois da centrifugação, as células que ficaram aderidas às lâminas foram coradas com o Kit para coloração Panótico Rápido. Ao final desse processo, as lâminas foram analisadas em microscópio óptico para análise da morfologia celular dos neutrófilos.

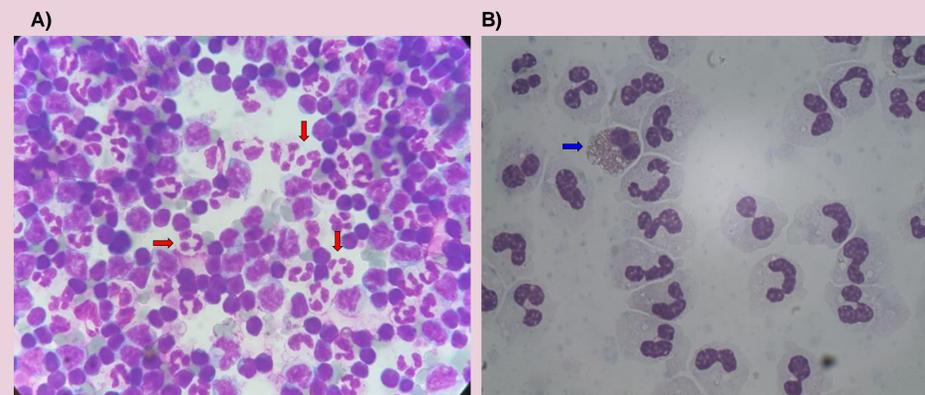


Figura 2: Análise da presença de neutrófilos após processamento por Ficoll. A) Presença de neutrófilos maduros de baixa densidade na camada de PBMC (seta vermelha). Aumento 40x. B) Camada de granulócitos com presença de neutrófilos (maioria) e eosinófilo (seta azul). Aumento 100x.

Desenvolvimento

As amostras de sangue periférico usadas no estudo foram obtidas de pacientes com hanseníase atendidos no Ambulatório Souza Araújo (FIOCRUZ, RJ, Brasil) antes do início do tratamento e após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Processamento de sangue por Ficoll - O processamento de sangue por Ficoll-Paque, que é um gradiente de densidade, tem por objetivo o fracionamento do sangue e a obtenção de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), através da centrifugação e separação das densidades. A primeira etapa consiste em colocar o sangue sobre o Ficoll em um tubo Falcon. O sangue é centrifugado a 300 xg por 30 minutos em temperatura ambiente. Como consequência das diferentes densidades, após a centrifugação, as células se separam. Na parte superior, localiza-se o plasma. Sob essa camada, há um "anel" de PBMC (células mononucleadas), seguido pelo Ficoll. Por último, encontra-se a camada de granulócitos junto com as hemácias. Depois disso, retira-se todo o sobrenadante, com o auxílio de uma pipeta sorológica, deixando apenas a parte vermelha. Em seguida, adiciona-se o ACK, responsável por lisar as hemácias, e por fim as células são lavadas com PBS 1X restando apenas os neutrófilos.

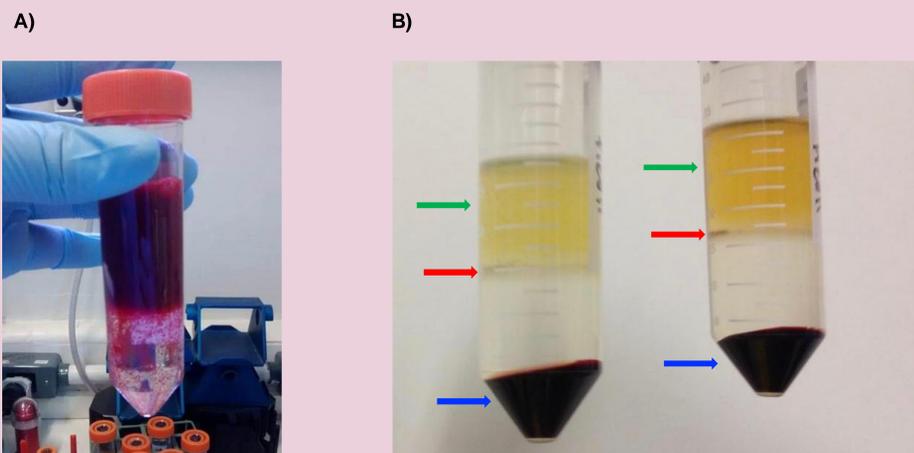


Figura 1: Processamento do sangue por Ficoll e separação das células. A) Sangue sobre o Ficoll em tubo Falcon e presença de hemácias se deslocando para o fundo do tubo antes da centrifugação. B) Após a centrifugação observa-se o plasma (seta verde), seguido de um "anel" de PBMC (células mononucleadas, seta vermelha), camada de Ficoll e por último, encontram-se os granulócitos (seta azul), sendo os neutrófilos os predominantes entre os granulócitos, além das hemácias, responsáveis pela coloração vermelha escuro do pellet.

Conclusão

Concluimos que o método de Ficoll é um bom método para a purificação de neutrófilos do sangue periférico de pacientes com hanseníase. E podemos confirmar a pureza e eficácia do Ficoll através da presença somente de neutrófilos e poucos eosinófilos na camada de granulócitos após a separação das células.

Bibliografia

- 1 - Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev 2006; 19(2):338-81.
- 2 - Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. Lepr Rev 1962; 33:119-128.
- 3 - Schmitz V, Tavares IF, Pignataro P, Machado A de M, Pacheco FDS, Dos Santos JB, et al. Neutrophils in Leprosy. Front Immunol. 2019;10: 495.
- 4 - WHO/World Health Organization - Global leprosy (Hansen disease) update, 2019: time to step-up prevention initiatives. Weekly Epidemiological Record 2020; 36; 95:417-440.
- 5 - Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nature Rev Immunol 2013; 13:159-175.

Agradecimentos

A todo o Laboratório de Hanseníase, em especial à Jéssica Brandão dos Santos e Thais Fernanda Rodrigues. As agências de fomento: CNPq e CAPES. E à FIOCRUZ.

