



AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE NEUTRÓFILOS DE BAIXA DENSIDADE (LDNs) PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM HIDRADENITE SUPURATIVA

AKÍRIA OHANA TORREÃO; ROBERTA CARDOSO DE SIQUEIRA; PATRÍCIA D'EMERY ALVES SANTOS; FABRÍCIO OLIVEIRA SOUTO; LUCAS ANDRÉ CAVALCANTI BRANDÃO

RESUMO

A Hidradenite Supurativa (HS) é uma doença inflamatória crônica frequentemente subdiagnosticada, que afeta principalmente mulheres, exercendo um impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes. No contexto específico da HS, os neutrófilos destacam-se pela expressiva contribuição no processo inflamatório e na resposta imune, incluindo a presença de uma subpopulação denominada neutrófilos de baixa densidade (LDNs). Esses LDNs têm sido identificados em diversas doenças inflamatórias e autoimunes, apresentando propriedades imunossupressoras e possuindo fenótipos pró-tumorais. Em vista disso, este estudo tem como objetivo avaliar a frequência de LDNs no sangue periférico de pacientes com HS e investigar suas associações com a progressão da doença. Foram recrutados pacientes do ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas-UFPE, classificados pela gravidade da HS segundo os critérios de Hurley e o "International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System" (IHS4). Amostras de sangue periférico foram coletadas, processadas e analisadas por citometria de fluxo para determinar a frequência de LDNs. Até o momento, 30 amostras foram processadas, das quais 11 foram analisadas. Os resultados indicam que pacientes em estágios avançados da HS apresentam maior frequência de LDNs. Dois pacientes no estágio I de Hurley apresentaram frequências de LDNs acima do valor de referência, já entre os seis pacientes no estágio II de Hurley, dois exibiram alta frequência de LDNs, enquanto apenas um dos três pacientes no estágio III de Hurley apresentou alta frequência de LDNs. Além disso, quatro pacientes foram classificados com HS leve pelo IHS4, três foram classificados com HS moderado, e quatro com HS grave. A investigação do impacto dos tratamentos revelou que pacientes sem tratamento ou com tratamentos tópicos, como Resorcinol, mostraram frequências elevadas de LDNs, enquanto a maioria dos pacientes em tratamento sistêmico não exibiu essa associação, com exceção de um paciente em uso de Adalimumabe. Estes resultados preliminares sugerem uma relação entre a presença de LDNs e a gravidade da HS, destacando a necessidade de ampliar a amostra para validação estatística robusta. O estudo contribui para a compreensão dos mecanismos imunológicos subjacentes à HS e pode auxiliar na melhoria das estratégias diagnósticas e terapêuticas, visando um manejo mais eficaz da doença.

Palavras-chave: Doença crônica; Lesões; Inflamação; PBMC; Citometria de fluxo.

1 INTRODUÇÃO

A hidradenite supurativa (HS) é uma doença inflamatória crônica subdiagnosticada no Brasil, caracterizada por inflamação perifolicular especialmente em áreas de dobras cutâneas. Com a progressão da inflamação aumentam-se os níveis de citocinas, acompanhados de uma intensa infiltração neutrofílica. A persistência de neutrófilos no tecido, sejam ativados ou mortos, colabora para formação de imunocomplexos, responsáveis por amplificar a resposta

imune (SILVA, 2015).

A presença de uma subpopulação específica de neutrófilos, denominados como neutrófilos de baixa densidade (LDN) “Low Density Neutrophils”, tem sido identificada em pacientes com diversas doenças inflamatórias e autoimunes, incluindo artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, sepse, câncer, vasculite e infecções por HIV (SCAPINI; CASSATELLA, 2014; WRIGHT et al., 2017). E mais recentemente, a caracterização dos neutrófilos de baixa densidade tem sido relacionada à gravidade de doenças, como na COVID-19 (CABRERA et al., 2021).

Os neutrófilos de baixa densidade recebem esse nome porque exibem propriedades alteradas de fluabilidade celular e, portanto, sedimentam dentro da fração de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs). Os LDNs apresentam propriedades imunossupressoras, possuindo fenótipos pró-tumorais (SHAUL, et al. 2020; HSU et al., 2020). Além disso, os LDNs apresentam uma maior capacidade de formar armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e de sintetizar mediadores pró-inflamatórios, como IFN do tipo 1, IFN- γ e TNF- α , em comparação com outra subpopulação de neutrófilos, denominados como neutrófilos de densidade normal (NDN) “Normal Density Neutrophils”, que exibem fenótipos antitumorais (DENNY et al., 2010; CARMONA-RIVERA; KAPLAN, 2013).

Os neutrófilos são proeminentes na pele lesionada de pacientes com HS, atuando na intensificação da inflamação e afetando a cicatrização das lesões (NAKABO; ROMO-TENA; KAPLAN, 2022). A hidradenite supurativa é uma doença debilitante, estigmatizante e de difícil tratamento que provoca graves impactos físicos e psicológicos. O diagnóstico, geralmente tardio, contribui para o agravamento do quadro clínico.

Neste contexto, o presente estudo tem por objetivo avaliar o perfil neutrofilico de pacientes com HS para demonstrar possíveis associações da presença de neutrófilos de baixa densidade com a progressão da doença e auxiliar os médicos na classificação fenotípica e no diagnóstico mais preciso e célere.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os pacientes que buscaram atendimento no ambulatório de Dermatologia do Hospital das Clínicas-UFPE foram convidados a participar do projeto de pesquisa e após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foram coletadas 2 amostras de sangue periférico em tubo contendo EDTA (4 ml cada). Os pacientes recrutados foram classificados de acordo com a gravidade da doença em dois sistemas de pontuação, os critérios de Hurley e o “International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System” (IHS4). O projeto se encontra aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) local sob o número: CAAE: 03096118.1.0000.5208.

Posteriormente, as amostras coletadas foram levadas ao laboratório de Imunologia do iLIKA/UFPE onde foram processadas em até 6 horas após a primeira coleta, respeitando o tempo de vida médio dos neutrófilos, que é de 6 a 12 horas na circulação (PILLAY et al., 2010; PRUCHNIAK et al., 2013; MAYADAS et al., 2014). A partir do sangue periférico coletado foi feito o isolamento das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) seguindo um protocolo pré-estabelecido para isolamento do PBMC. O Ficoll-hypaque foi utilizado para promover a separação por densidade do PBMC dos demais elementos do sangue. A viabilidade celular foi avaliada através da contagem de células na câmara de Neubauer.

O PBMC isolado foi marcado com os seguintes marcadores, de acordo com a instrução do fabricante (BD System): CD15 (BV711), L&D (BV570), CD3 (FITC), CD16 (BV480), CD11b (PE-CF594), CD14 (A700) e fixado com PFA 2%. Esses marcadores permitem determinar perfil e polaridade dos granulócitos (CABRERA et al., 2021; LOKUTA; NUZZI; HUTTENLOCHER, 2007).

Em seguida, a frequência de neutrófilos de baixa densidade foi avaliada pela tecnologia

de citometria de fluxo e os dados obtidos foram analisados através do pacote de software para análise de dados de citometria de fluxo (FlowJo).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o presente momento, 30 amostras foram processadas, marcadas, fixadas e avaliadas pela tecnologia de citometria de fluxo. Desse total, 11 amostras foram analisadas no FlowJo e os dados obtidos foram organizados de modo a possibilitar a associação entre a frequência de LDNs presente no sangue periférico dos pacientes, as características demográficas (sexo e idade) da população em estudo e os sistemas de pontuação (Hurley e IHS4), conforme mostra a Tabela 1. As 19 amostras restantes ainda serão analisadas no FlowJo e os resultados obtidos serão inseridos na Tabela 1.

Tabela 1. Características clínicas e contagem dos pacientes diagnosticados com HS incluídos no estudo.

Nº	Sample:	Singlets/Mono /Live/CD11b+/CD16+/CD15+ CD14- Freq. of Parent	Sexo	Idade	Hurley	IHS4
1	Paciente 191	2,45	Feminino	46	I	11
2	Paciente 15	1,17	Masculino	38	III	> 11
3	Paciente 110	3,82	Masculino	27	II	0
4	Paciente 166	0,61	Masculino	27	II	8
5	Paciente 171	6,52	Masculino	17	II	3
6	Paciente 189	0,86	Masculino	15	II	4
7	Paciente 161	1,71	Feminino	49	II	10
8	Paciente 026	0,22	Feminino	48	III	> 11
9	Paciente 132	4,83	Masculino	27	III	> 11
10	Paciente 165	2,36	Feminino	19	I	0
11	Paciente 190	1,28	Feminino	36	II	0
Controle	Todas as marcações	2,28	Controle			

A HS geralmente tem início entre a puberdade e os 40 anos e afeta mais comumente mulheres do que homens, em uma proporção de aproximadamente 3 para 1 (BALLARD; SHUMAN, 2022); um estudo retrospectivo mostrou que a prevalência para mulheres foi mais do que o dobro da dos homens (GARG et al., 2017). Outro estudo, este de coorte, realizado nos EUA confirmou esses achados, com 63,3% dos pacientes com HS tendo entre 18 e 44 anos e 75,6% sendo mulheres (SLYPER et al., 2018).

Nosso estudo corrobora esses achados, uma vez que, atualmente, há cerca de 200 pacientes diagnosticados com HS em tratamento no ambulatório de dermatologia do HC-UFPE. A maioria desses pacientes está na faixa etária de 18 a 44 anos, conforme detalhado na Tabela 1, sendo que mais da metade são do sexo feminino. Apesar de a Tabela 1 indicar que a proporção de mulheres e homens em relação ao total de pacientes é de 45,45% e 54,55%, respectivamente, essa distribuição não representa o número total efetivo de pacientes com HS incluídos na pesquisa. Isso se deve à necessidade de prosseguirmos com a coleta e análise de amostras para aumentar o número de participantes (N) e obter uma compreensão estatística mais robusta do panorama geral.

Vários sistemas de pontuação são comumente usados para avaliar a gravidade e extensão das lesões na HS, incluindo os estágios de Hurley, o escore de hidradenite supurativa

Sartorius, a avaliação global da hidradenite supurativa (HS-PGA), resposta clínica da hidradenite supurativa (HiSCR), entre outros (JAFARI et al., 2020). Os critérios de Hurley são usados para classificar a HS em três estágios diferentes e embora sejam úteis para a classificação inicial da HS, eles são estáticos e podem não ser sensíveis o suficiente para acompanhar as mudanças clínicas ao longo do tempo ou para avaliar a eficácia do tratamento (Tabela 2) (ZOUBOULIS et al., 20151).

Tabela 2. Estágios de Hurley

Estágio I	Formação de abscessos, únicos ou múltiplos, sem fistulas ou cicatrização.
Estágio II	Abscessos recorrentes, lesões únicas ou múltiplas e muito separadas, com formação de túneis e/ou cicatrizes.
Estágio III	Envolvimento difuso ou quase difuso ou múltiplos túneis e abscessos interconectados em toda a área.

Dado extraído e adaptado de SABAT et al., 2020.

De acordo com a Tabela 1, seis pacientes foram classificados como estágio II de Hurley, dos quais dois exibiram uma alta frequência de LDNs, com valores de 6,52 e 3,82. Entre os três pacientes classificados no estágio III de Hurley, apenas um apresentou uma alta frequência de LDNs, registrando um valor de 4,83. Dois pacientes foram classificados como estágio I de Hurley, ambos apresentando frequências de LDNs acima do valor de referência, com valores de 2,45 e 2,36. Assim, totalizam-se cinco pacientes com frequências de LDNs superiores ao valor de referência.

Em contraste, seis pacientes apresentaram frequências de LDNs abaixo do valor de referência. Desses, dois foram classificados como estágio III de Hurley e quatro como estágio II de Hurley. Com o progresso da pesquisa e o aumento do número de pacientes (N), esses resultados poderão ser revisados.

Já o “International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System” (IHS4) é um sistema de pontuação mais recente que foi desenvolvido para avaliar a gravidade da HS de uma forma mais completa e abrangente. Ele leva em consideração quatro aspectos da doença: lesões, sintomas, extensão da doença e qualidade de vida; e a pontuação é baseada na contagem de nódulos inflamatórios, abscessos e túneis. O IHS4 pode ser usado para avaliar a gravidade da doença em pacientes com qualquer nível de gravidade e pode ser útil para detectar mudanças na doença ao longo do tempo (Tabela 3) (ZOUBOULIS et al., 2017).

Tabela 3. International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (IHS4)

Leve	≤ 3 pontos (número de nódulos inflamatórios $\times 1$ e número de abscessos $\times 2$)
Moderado	4–10 pontos (número de nódulos inflamatórios $\times 1$, número de abscessos $\times 2$ e número de túneis de drenagem $\times 4$)
Grave	≥ 11 pontos (número de nódulos inflamatórios $\times 1$, número de abscessos $\times 2$ e número de túneis de drenagem $\times 4$)

Dado extraído de SABAT et al., 2020.

De acordo com a Tabela 1, quatro pacientes foram classificados com um nível de gravidade leve da Hidradenite Supurativa. Três pacientes foram categorizados com um nível de gravidade moderado, enquanto quatro pacientes foram identificados com um nível de gravidade severo da HS. Importa salientar que essa classificação foi determinada no dia da coleta das amostras de sangue periférico. Diferentemente dos estágios de Hurley, que constituem uma classificação estática, o Índice de Gravidade da Hidradenite Supurativa (IHS4) pode variar ao longo do tratamento.

Ressalta-se que, no dia da coleta, cinco pacientes estavam sem tratamento. Desses, dois apresentaram uma frequência de LDNs acima do valor de referência, com valores de 2,45 e 2,36. Três pacientes estavam usando apenas Resorcinol 15% creme; entre eles, dois apresentaram alta frequência de LDNs, com valores de 6,52 e 3,82. Um paciente estava em uso de Metformina 1,5 g/dia, outro em terapia combinada de Tetraciclina 1 g/dia e Resorcinol 15% creme, e um último paciente estava usando Adalimumabe. Apenas o paciente em uso do imunobiológico apresentou uma alta frequência de LDNs, com um valor de 4,83.

Devido à escassez de evidências científicas que estabeleçam uma associação entre a frequência de LDNs no sangue periférico de pacientes com Hidradenite Supurativa e a gravidade e progressão da doença, é imperativo ampliar o número de participantes no estudo para obter resultados mais completos e fidedignos.

4 CONCLUSÃO

Os resultados preliminares reforçam a prevalência da HS entre mulheres, corroborando estudos anteriores que demonstraram uma proporção significativamente maior de pacientes do sexo feminino afetados pela doença. Além disso, a faixa etária predominante dos pacientes diagnosticados com HS, que se concentra entre 18 e 44 anos, confirma a tendência observada em estudos epidemiológicos anteriores.

A análise dos dados de pacientes classificados nos estágios de Hurley e nos níveis de gravidade da HS pelo IHS4 revelou uma associação significativa entre a frequência de LDNs e a gravidade da HS, evidenciando que pacientes com estágios mais avançados da doença apresentam maior frequência de LDNs circulantes, sugerindo que esses neutrófilos podem desempenhar um papel importante na intensificação da resposta inflamatória característica da HS.

Além disso, a investigação do uso de diferentes tratamentos para HS revelou insights valiosos. Enquanto alguns pacientes em tratamento tópico apresentaram frequências de LDNs elevadas, outros em tratamento sistêmico não demonstraram tal associação, exceto um paciente em uso de Adalimumabe.

A continuação deste estudo, com o aumento do número de amostras e participantes, permitirá uma análise estatística mais robusta, fortalecendo as conclusões iniciais e contribuindo para a elaboração de algoritmos de diagnóstico clínico-molecular mais precisos. Em última análise, esses esforços visam melhorar a precisão diagnóstica e a eficácia dos tratamentos para pacientes com HS, mitigando os impactos físicos e psicológicos desta doença inflamatória crônica.

REFERÊNCIAS

BALLARD, K.; SHUMAN, V.L. Hidradenitis Suppurativa. [Updated 2022 Jul 15]. **In: StatPearls [Internet]**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534867/>.

CABRERA, L. E. et al. Characterization of low-density granulocytes in COVID-19. **PLOS Pathogens**, v. 17, n. 7, p. e1009721. 2021.

CARMONA-RIVERA, C.; KAPLAN, MJ. Low-density granulocytes: a distinct class of neutrophils in systemic autoimmunity. **Semin Immunopathol.** 35(4):455-63. 2013.

DENNY, M.F.; YALAVARTHI, S.; ZHAO, W.; THACKER, S.G.; ANDERSON, M.; SANDY, A.R.; et al. A distinct subset of proinflammatory neutrophils isolated from patients with systemic lupus erythematosus induces vascular damage and synthesizes type I IFNs. **J Immunol.** 184:3284–3297. 2010.

GARG, A.; KIRBY, J.S.; LAVIAN, J.; LIN, G.; STRUNK, A. Sex- and Age-Adjusted Population Analysis of Prevalence Estimates for Hidradenitis Suppurativa in the United States. **JAMA dermatology**; 153(8):760-764. 2017.

GUBBIOTTI, M. A.; BALOCH, Z. An Overview of Pituitary Neuroendocrine Tumors (PitNET) and Algorithmic Approach to Diagnosis. **Advances in Anatomic Pathology**, v. Publish Ah. 2022.

HSU, BE.; ROY, J.; MOUHANNA, J.; RAYES, R.F.; RAMSAY, L.; TABARIÈS, S.; et al. C3a elicits unique migratory responses in immature low-density neutrophils. **Oncogene.** Apr; 39(12):2612–23. 2020.

JAFARI, S.M.S.; HUNGER, R.E.; SCHLAPBACH, C. Hidradenitis Suppurativa: Current Understanding of Pathogenic Mechanisms and Suggestion for Treatment Algorithm. **Front. Med.** 7, 68. 2020.

LOKUTA, M. A.; NUZZI, P. A.; HUTTENLOCHER, A. Analysis of Neutrophil Polarization and Chemotaxis. [S.l: s.n.], 2007. p. 211–229. KYRIAKOU, A. et al. Efficacy of adalimumab in moderate to severe hidradenitis suppurativa: Real life data. **Dermatology Reports**, v.10, n.2. 2018.

MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annual review of pathology**, v. 9, p. 181–218, 2014.

NAKABO, S.; ROMO-TENA, J.; KAPLAN, M. J. Neutrophils as Drivers of Immune Dysregulation in Autoimmune Diseases with Skin Manifestations. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 142, n. 3, p. 823–833. 2022.

PILLAY J.; DEN BRABER I.; VRISEKOOOP N.; KWAST LM.; DE BOER RJ.; BORGHANS JA.; TESSELAAR K.; KOENDERMAN L. In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood.** 116: 625-627. 2010.

PRUCHNIAK, M. P.; ARAZNA, M.; DEMKOW, U. Life of neutrophil: From stem cell to neutrophil extracellular trap. **Respiratory Physiology & Neurobiology.** 187:68–73. 2013.

SABAT, R.; JEMEC, G.B.E.; MATUSIAK, Ł.; KIMBALL, A.B.; PRENS, E.; WOLK, K. Hidradenitis suppurativa. **Nature Reviews Disease Primers**, 6(1). 2020.

SCAPINI, P.; CASSATELLA, M.A. Social networking of human neutrophils within the immune system. **Blood**. 2014 Jul 31;124(5):710-9. doi: 10.1182/blood-2014-03-453217. Jun 12. 2014.

SHAUL, M.E.; EYAL, O.; GUGLIETTA, S.; ALONI, P.; ZLOTNIK, A.; FORKOSH, E.; et al. Circulating neutrophil subsets in advanced lung cancer patients exhibit unique immune signature and relate to prognosis. **The FASEB Journal**. 34(3):4204–18. 2020.

SILVA IC. Neutrophils: classical aspects, plasticity and new immunoregulatory functions. **Rev. Int. Est. Exp.** 7 (único): 35-46. 2015.

SLYPER, M.; STRUNK, A.; GARG, A. Incidence of sexual dysfunction among patients with hidradenitis 395 suppurativa: a population-based retrospective analysis. **Br J Dermatol**. February 2018. 396

WRIGHT, H.L.; MAKKI, F.A.; MOOTS, R.J.; EDWARDS, S.W. Low-density granulocytes: functionally distinct, immature neutrophils in rheumatoid arthritis with altered properties and defective TNF signalling. **J Leukoc Biol**. Feb; 101(2):599-611. 2017.

ZOUBOULIS, C.C.; TZELLOS, T.; KYRGIDIS, A.; JEMEC, G.B.E.; BECHARA, F.G.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; INGRAM, J.R.; KANNI, T.; KARAGIANNIDIS, I.; MARTORELL, A.; MATUSIAK, Ł.; PINTER, A.; PRENS, E.P.; et al. Development and validation of the International Hidradenitis Suppurativa Severity Score System (IHS4), a novel dynamic scoring system to assess HS severity. **Br J Dermatol**. Nov;177(5):1401-1409. 2017.