

Maria Esther Salles Nogueira  
Fátima Regina Vilani Moreno  
Eliane Aparecida Silva  
Maria Sueli Parreira de Arruda

## Imunologia básica

Como vivemos em um ambiente repleto de microrganismos, parece estranho que não tenhamos infecções com maior frequência. Isso só é possível porque somos dotados de mecanismos que visam manter nossa integridade biológica.

O sistema imune faz parte desse importante processo que, funcionalmente sadio, torna-se um mecanismo eficiente na defesa contra agentes estranhos e células neoplásicas. Para que o sistema imune cumpra sua função, é necessário que os eventuais agressores sejam identificados, ou seja, que somente moléculas estranhas ao código genético do organismo sejam imunogênicas.

Embora quase todos os tipos de moléculas biológicas possam atuar como antígenos (Ag), apenas as macromoléculas podem desencadear a resposta imune e, somente uma pequena fração dessa macromolécula, é especificamente reconhecida pelo sistema imune. Essa porção é denominada epítipo ou determinante antigênico. Geralmente as macromoléculas exibem epítipos diversos que podem desencadear respostas imunes diferentes.

Os principais componentes celulares do sistema imune são os linfócitos e as células apresentadoras de antígenos, representadas, principalmente, pelas células de Langerhans, células interdigitantes, dendríticas foliculares e macrófagos.

Os linfócitos são células responsáveis pela especificidade da resposta imune, capazes de reconhecer e distinguir diferentes determinantes antigênicos de modo a promover a homeostasia do organismo. Essas células compreendem duas classes distintas em suas funções e produtos, denominadas linfócitos B (LB) e linfócitos T (LT).

### a) Linfócitos T

Os LT provêm de células indiferenciadas da medula óssea, migram para o timo e passam a expressar em sua superfície várias moléculas que irão determinar as subpopulações celulares com funções distintas. Embora a competência imune tenha sido adquirida nessa fase de migração, ela somente será efetiva quando os linfócitos povoarem os tecidos linfóides secundários (linfonodos, baço, tecidos linfóides das mucosas), onde residirão como IT auxiliares (LTH), LT citotóxicos / supressores (LTC/LTS).

A análise e identificação desses subgrupos de LT só foi possível devido ao fato de eles expressarem proteínas de membrana diferentes entre si. Assim, a maioria dos LTH expressam em sua membrana uma proteína referida como CD4<sup>+</sup> e os LTC /LTS outra, denominada CD8<sup>+</sup> (a nomenclatura CI) significa *cluster of differentiation* ou grupos de diferenciação e se referem aos grupos de anticorpos

monoclonais que se ligam especificamente a determinadas glicoproteínas na superfície das células). Tanto os linfócitos citotóxicos como os supressores são considerados CD8<sup>+</sup>.

Os linfócitos T auxiliares (LTH CD4<sup>+</sup>) compreendem as células efetoras do sistema imune que participam no desenvolvimento da resposta celular e humoral. De modo geral, a indução da resposta imune compreende quatro etapas: 1-processamento do Ag; 2-reconhecimento do Ag pelos LT CD4<sup>+</sup>; 3-ativação dos LT CD4<sup>+</sup> e 4-liberação de citocinas, que agem sobre os próprios LT, e sobre outros tipos celulares, incluindo LB, macrófagos e granulócitos.

As citocinas são responsáveis por um grande número de ações sobre várias células e constituem uma rede com múltiplas interações que servem para regular todos os processos biológicos importantes, tais como, crescimento e ativação celular, inflamação, imunidade, reparo tecidual, fibrose, morfogênese e algumas são, ainda, fatores quimiotáticos. Essas citocinas podem atuar sobre a própria célula que a sintetizou (ação autócrina), agir sobre células próximas (parácrina) ou órgãos distantes da célula que a produziu (endócrina). Uma mesma citocina pode desempenhar várias funções e várias citocinas podem ter a mesma função.

Atualmente, é possível compreender melhor a função das subpopulações de linfócitos regulados pelas citocinas. Hoje sabemos que Li CD4<sup>+</sup> na presença de interleucina-12 (IL-12) e ausência de IL-4 se diferenciam em LTH 1 (*LT helper 1*). Esse subtipo de célula secreta principalmente dois tipos de citocinas: a IL-2 e IFN $\gamma$  7 (interferon gama), envolvidas na ativação da imunidade celular frente a infecções causadas por bactérias, vírus, fungos e protozoários. Por outro lado, os LT CD4<sup>+</sup> em contato com a IL-4 se transformam em LTH 2 (*LT helper 2*), outro subtipo de célula que está envolvida na ativação da imunidade humoral. Esses linfócitos secretam principalmente as IL-4, IL 5, IL-6 e IL-10.

O subtipo LTHO é o menos conhecido, mas parece incluir células que secretam tanto citocinas liberadas pelas TH1 como pelas T112.

Tem sido sugerido que a ativação diferencial de LTH1 ou LTH2 poderia ser responsável pelos aspectos clínicos e patológicos de certas doenças infecciosas. Assim, é possível que a lesão granulomatosa observada nas infecções causadas por micobactérias esteja relacionada à estimulação de LTH1. Por outro lado, respostas descontroladas de LTH 1 e LTH2 poderiam causar doenças auto-imunes e alergias.

Os linfócitos supressores (LT CD8<sup>+</sup>) têm como função a inibição da ativação da resposta imune. Seu desempenho assume grande importância tanto prevenindo o desenvolvimento de resposta aos Ag próprios, como a resposta exacerbada aos Ag estranhos. Os mecanismos, através dos quais os LTs executam suas funções, não estão totalmente esclarecidos. A purificação dessas células em número suficiente para análises bioquímicas e a clonagem molecular dos fatores supressores liberados por elas também não têm tido sucesso. Portanto, ainda não foi possível construir um modelo para a

especificidade, modo de ação ou função dessas células. É possível, ainda, que as células supressoras não formem uma população distinta, mas na verdade expressem funções imunes diferentes que dependem das concentrações de citocinas.

O mecanismo de ação mais conhecido dos LT CD8<sup>+</sup> é a produção de citocinas que, ao serem liberadas em excesso, atuam com efeito inibitório. Como as citocinas exercem efeitos estimulantes ou inibitórios sobre linfócitos, a natureza e a resposta imune global será dependente de suas concentrações. Assim, por exemplo, o excesso de TGFβ (fator transformador do crescimento-beta) poderá inibir a resposta imune e as células que secretam grandes quantidades dessa citocina poderão funcionar como células supressoras.

Os LT CD8<sup>+</sup> citotóxicos são especializados na morte de células que expressam Ag endógenos (Ag produzidos no interior da própria célula alvo) associados às moléculas de classe T do MHC (*major histocompatibility complex*).

Dessa forma, células que apresentam Ag codificados por vírus ou genes anormais são reconhecidos e eventualmente destruídos pelos LTC. Portanto, são importantes células de defesa nas infecções virais, rejeição de enxertos e tumores. Como a função desses linfócitos é a morte da célula alvo, durante o processo de diferenciação, desenvolvem todo um aparato necessário para realizar suas funções. O processo de lise consiste em cinco fases: 1- inicialmente, é necessário que o linfócito reconheça o Ag na superfície da célula alvo, junto com moléculas de classe I do MHC, e a ele se una; 2 - essa ligação resultará na ativação do LTC e 3 - no chamado "choque letal"; no qual os linfócitos liberam grânulos de perforina (proteína presente dentro do grânulo que em contato com concentrações extracelulares de cálcio pode polimerizar e formar poros na membrana celular) e granzima B (serina-protease que cliva principalmente substratos de proteínas nos resíduos de ácido aspártico). Na fase 4 - ocorre a separação do linfócito + célula alvo, resultando em 5 - citólise da célula-alvo por apoptose e lise osmótica.

Cabe ainda lembrar, a existência de um subgrupo de linfócitos encontrados no sangue e tecidos linfóides, denominados células matadoras naturais ou *natural killer* (NK). Seu papel na imunidade não está bem esclarecido, mas é amplamente admitido que essas células sejam filogeneticamente TS primitivos que não possuem receptor específico para o reconhecimento de Ag. As células NK têm a capacidade de matar células tumorais, principalmente as de origem hematopoiéticas, células normais infectadas por vírus e células transplantadas. O papel das células NK na resposta imune não está completamente consolidado. Admite-se que as células NK servem para lisar células infectadas por vírus em menos tempo que os LTC, durante os primeiros dias da infecção viral.

## b) Macrófagos

Os macrófagos são células que pertencem ao sistema mononuclear fagocitário (SMF) e que se originam a partir de uma célula primitiva presente na medula óssea (MO), que por sua vez for

orará sucessivamente o monoblasto, o promonócito e o monócito sanguíneo. Do sangue periférico, o monócito migra para os tecidos diferenciando-se localmente; dessa forma, encontram-se representantes celulares desse sistema em diversos compartimentos, distribuídos em vários tecidos, Órgãos e cavidades serosas. Embora a maior parte dos macrófagos se origine da migração de monócitos do sangue, uma pequena proporção (menos que 5%) pode se multiplicar localmente nos tecidos.

Entre as principais funções exercidas pelos macrófagos estão a endocitose de partículas, a síntese de moléculas importantes para a resposta inflamatória e imune e o processamento e a apresentação antigênica para os CT e LB.

## Endocitose

A endocitose é a capacidade que os monócitos-macrófagos apresentam de ingerir materiais solúveis ou particulados. Dá-se o nome de pinocitose à ingestão de materiais menores que 0,1/μm e fagocitose ao englobamento de materiais maiores que 0,1 μm.

A fagocitose inicia-se com a aderência da partícula a ser fagocitada à membrana celular do fagócito, acompanhada da emissão de pseudópodos que terminam por envolver toda a partícula que é posteriormente interiorizada. Forma-se o fagossoma, contendo um envoltório de constituição semelhante à própria membrana celular. Os lisosomas deslocam-se em direção ao fagossoma e, após a fusão desses, forma-se o fagolisossoma. As enzimas digestivas dos lisosomas (lisozima, hidrolases ácidas, lactoferrina, etc) participam da digestão intracelular da partícula. A partir da interação da partícula com a membrana celular do fagócito, formam-se substâncias altamente tóxicas que participam dos mecanismos microbicidas destas células.

O fenômeno da fagocitose pode ser facilitado por determinadas substâncias denominadas opsoninas. Partículas revestidas por anticorpos ou por certos produtos da ativação do sistema complemento (SC) aderem à membrana do fagócito e são interiorizadas mais rápida e intensamente do que partículas não opsonizadas. Na membrana do macrófago, existem moléculas de superfície, conhecidas por receptores, que têm afinidade por estas opsoninas. Os macrófagos possuem receptores para a fração Fc das imunoglobulinas (Ig) TgG1 e IgG3, bem como para os componentes C3b e C4b do SC e, dessa forma, partículas opsonizadas por moléculas de anticorpos (IgG1 ou IgG3) ou complemento (C3b ou C4b) passam a ser rapidamente internalizadas.

## Produtos de secreção dos macrófagos

Os macrófagos produzem e secretam várias substâncias biologicamente importantes para a resposta inflamatória e imune como: citocinas, enzimas, metabólitos do ácido aracônico, componentes do SC e reativos intermediários do oxigênio (*reactive oxygen intermediates - ROI*) e do nitrogênio (*reactive nitrogen intermediates - RNI*).

Os macrófagos produzem várias citocinas, entre elas a IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). A IL-1 atua sobre os IT levando à produção de linfocinas, especialmente a TL-2, bem como aumentando a expressão de receptores para IL-2. A IL-6 tem ações muito semelhantes a IL-1, porém, atua também sobre os LB promovendo sua diferenciação terminal em células secretoras de Ig. O TNF $\alpha$  apresenta atividades biológicas diversificadas, isto é, induz a produção de linfocinas e a expressão de receptores para IL-2 pelos IT, aumenta a produção de anticorpos (Ac) e promove a proliferação dos LB, atua como quimiotático para monócitos-macrófagos e induz a produção de IL-1, IL-6 e IL-8 por macrófagos.

Com relação aos ROI e RNI, são sistemas bioquímicos antimicrobianos dos fagócitos mononucleares de vital importância na defesa do organismo contra as infecções. Conforme foi citado anteriormente, quando ocorre a interação entre a partícula a ser fagocitada e o fagócito, observa-se um aumento na respiração celular, conhecido por explosão respiratória, sendo gerados o ânion superóxido (O $_2^-$ ) e a água oxigenada (H $_2$ O $_2$ ) que podem ser convertidos para formar o radical hidroxila (OH) e o oxigênio simples (O $_2$ ). Esses metabólitos do oxigênio são altamente tóxicos para os microrganismos e reagem com a maioria das moléculas orgânicas, como DNA, proteínas e lipídeos, alterando-as.

Quanto aos RNI, o óxido nítrico (NO) foi recentemente identificado como um novo sistema antimicrobiano do macrófago. Estudos têm sugerido que o NO tem ação antimicrobiana contra certos fungos, bactérias, protozoários extracelulares e intracelulares e células tumorais. Ao que parece, o NO é capaz de se ligar ao ferro, presente no grupo prostético de enzimas importantes para a replicação e desempenho das atividades vitais do microrganismo, levando-o à morte.

### Funções do macrófago na resposta imune

O macrófago participa da resposta imune através de duas grandes vias: aferente e eferente. Em seu papel aferente, o macrófago atua como uma célula apresentadora de antígeno (*antigen-presenting cell* - APC) ao LT.

Resumidamente: a APC endocita o patógeno que é processado nos vacúolos endocíticos no citoplasma pela ação das enzimas proteolíticas, gerando peptídeos imunogênicos. Em algum ponto de seu trajeto, vesículas contendo moléculas de classe II do MHC se fundem aos endossomos e se ligam aos peptídeos imunogênicos, transportando-os para a superfície da célula, onde se tornam acessíveis aos LTH (CD4 $^+$ ) específicos para aquela combinação particular de epítipo-moléculas de classe II. A ligação do receptor do ET CD4 $^+$  a esse complexo, juntamente com a liberação de IL-1 pela APC, ativam os LT CD4 $^+$ . Essas células ativadas passam a expressar receptores para IL-2 e a produzirem TL-2, o que estimula o crescimento dos TT e a produção de outras citocinas importantes na ativação de outros tipos celulares.

Dentre as linfocinas liberadas pelos LT CD4 $^+$ , encontra-se o

IFN  $\gamma$ , uma linfocina chave na ativação macrofágica. Os macrófagos ativados exercem importante papel na resistência do hospedeiro a patógenos intracelulares obrigatórios e facultativos, uma vez que esses patógenos podem sobreviver e se multiplicar em macrófagos não ativados. Assim, o macrófago ativado participa da resposta imune através da via eferente.

Os macrófagos ativados apresentam alterações funcionais e morfológicas, como: aumento de aderência e espraiamento sobre o vidro, modificações bioquímicas e enzimáticas, liberação aumentada dos ROI e dos RNI e potencialização das funções fagocíticas, microbicidas e citotóxicas.

### c) Linfócitos B

Os LB se originam a partir de células indiferenciadas da medula óssea, onde sofrem rearranjos e alterações estruturais. Ao saírem da medula, vão povoar os tecidos linfóides periféricos e interagir com proteínas, ácidos nucleicos, polissacarídeos, lipídeos ou pequenos agentes químicos. Quando ocorre essa interação, os LB sofrem modificações tornando-se os plasmócitos secretores de Ig, também chamadas de anticorpos. Outros LB maduros entram em latência e persistem como linfócitos de memória; quando ocorrer uma segunda exposição ao Ag que lhes deu origem, essas células se ativam e secretam Tg que, ligando-se aos Ag, iniciam várias funções efetoras do sistema imune. Esse tipo de resposta é denominada resposta imune humoral, uma vez que as substâncias envolvidas estão presentes nos fluidos corporais (humores). A imunidade humoral é desencadeada particularmente contra microrganismos extracelulares e suas toxinas que, livres nos tecidos ou circulação, sofrem a ligação com as Ig facilitando sua remoção.

A unidade básica da Ig é o monômero, que ao ser determinada por cristalografia de raio-X e microscopia eletrônica, apresentou-se como uma molécula em forma de Y. Um monômero compreende duas cadeias polipeptídicas maiores denominadas cadeias pesadas (H - *heavy*) e duas menores, denominadas cadeias leves (L - *light*). Cada cadeia leve é fixada a uma cadeia pesada por pontes de dissulfeto. As duas cadeias pesadas também se ligam entre si pelas mesmas pontes. A molécula de Ig tem funções distintas: uma região é responsável pela ligação ao Ag (*Fab* - *fragment antigen-binding*), enquanto a outra região (*Fc* - *fragment crystalline*) se liga ao tecido das células do hospedeiro e ao primeiro componente do SC.

Apesar de todas as moléculas de Ig serem construídas da mesma maneira, a partir de quatro cadeias polipeptídicas, elas podem ser divididas em classes ou subclasses distintas de acordo com pequenas diferenças físico-químicas, tais como tamanho e solubilidade. Os seres humanos apresentam cinco classes de Ig designadas como IgM, IgG, IgA, IgE e IgD. As classes IgA e IgG apresentam ainda subclasses denominadas IgA1, IgA2, IgA secretora e IgG1, IgG2, IgG3, IgG4.

## Imunoglobulinas

### IgG

Constitui 70-75% do total das Ig do soro, sendo a principal Ig sintetizada durante a resposta secundária. Pela sua propriedade em atravessar a placenta, é importante na defesa contra infecções durante as primeiras semanas de vida do recém nascido. A classe IgG tem distribuição uniforme nos espaços intra e extravasculares, mas se difundem com maior facilidade nos compartimentos extravasculares, onde neutralizam toxinas bacterianas e se ligam a microrganismos, facilitando a fagocitose (opsonização). As IgG são eficazes nas reações de precipitação, aglutinação e fixação de complemento, embora nas duas últimas a IgM seja mais eficiente.

De acordo com as diferenças antigênicas das regiões constantes das cadeias pesadas, as TgG foram subdivididas em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A concentração dessas classes no soro é de aproximadamente 66%, 23%, 7% e 4% respectivamente. A IgG3 é a subclasse que fixa melhor o complemento.

### IgM

Aproximadamente 10% das Tg séricas normais pertencem à classe IgM. Essa molécula consiste em um pentâmero abrangendo cinco subunidades unidas por uma cadeia polipeptídica denominada cadeia J. Esses Ac encontram-se em grande parte confinados no espaço intravascular e são os primeiros que se formam em resposta aos patógenos antigenicamente complexos. Possuem alto poder aglutinante e fixam complemento. As hemaglutininas anti-A e anti- B e muitos dos Ac "naturais" pertencem geralmente à classe IgM.

### IgA

A IgA secretora (IgAs) aparece seletivamente na saliva, lágrima, fluidos nasais, suor, colostro, secreções pulmonares e trato gastrointestinal. Em humanos, a molécula secretória de IgA constitui-se de duas subunidades de IgA, um componente secretor (para facilitar o transporte e proteger da ação proteolítica) e uma cadeia J (necessária para unir as duas subunidades). Essa Ig está envolvida nos mecanismos de defesa primária contra infecções locais. Parece que sua principal função não é a destruição dos microrganismos, mas sim impedir sua aderência à superfície das células mucosas, inibindo a penetração dos patógenos nos tecidos.

A IgA sérica contribui com aproximadamente 15-20% do total de Ig séricas humanas e encontra-se, normalmente, sob a forma monomérica ou polimérica.

### IgE

No soro, a IgE é encontrada em concentrações muito baixas, compreendendo apenas 0,004% do total das Ig séricas. Embora em pequenas quantidades, apresentam uma ligação de alta afinidade

de nas superfícies dos mastócitos e basófilos em todos os indivíduos. Qualquer Ag que estimule a produção de IgE é denominado genericamente de alérgeno. A IgE se fixa aos tecidos pela fração Fc e ao alérgeno pela porção Fab. Quando em contato com o Ag, a IgE desencadeia a liberação de histamina e diversas enzimas, responsáveis pelo fenômeno anafilático. O papel biológico de defesa das IgE ainda não está bem definido, mas tem-se evidenciado elevação do nível sérico de IgE em certas parasitoses, particularmente nas infestações por helmintos.

### IgD

Constitui menos de 1% do total das Ig séricas, mas está presente, juntamente com a IgM, em grandes quantidades na membrana de LB. Até há pouco tempo, não havia qualquer evidência de IgD com atividade de Ac. Atualmente, existem alguns dados sobre IgD com atividade para certos Ag como insulina, penicilina, proteínas do leite, toxóide diftérico, Ag nucleares e tiroídianos.

### Anticorpos Monoclonais

Considerando que um Ag possui vários epítopos e que cada LB reconhece apenas um deles, a introdução de um Ag em um animal imunologicamente competente, resulta na formação de vários clones de células B. Os vários Ac resultantes dessa estimulação são denominados Ac policlonais, enquanto que os Ac resultantes da estimulação de cada LB em particular, são denominados Ac monoclonais.

Recentemente, a descoberta da possibilidade de fusão entre LB e células do mieloma múltiplo (que se caracterizam pela proliferação anormal de plasmócitos) possibilitou aos imunologistas a preparação e utilização de quantidades ilimitadas de Ac homogêneos, denominados anticorpos monoclonais.

Em 1975, Kohler & Milstein publicaram o sucesso obtido na produção de células híbridas, capazes de produzir Ac monoclonais. A técnica em si é relativamente simples e se encontra resumida no esquema abaixo:

Um animal é imunizado para se obter grandes quantidades de Ac. Após essa primeira estimulação, o animal é novamente provocado com dose maior do Ag, dois a quatro dias após a última estimulação; as células são coletadas e fundidas com células de mieloma. Dessa fusão resultam células híbridas que contêm material genético dos dois tipos celulares. Desse modo, as células híbridas retêm, das células do mieloma, o potencial de replicação e dos LB a capacidade de produção de Ac.

Em meio de cultura seletivo, as células não fusionadas morrem e as híbridas sobrevivem. Nesse estágio, as híbridas são separadas e, após 7 a 14 dias, o crescimento é suficiente para que se possa evidenciar a existência de células capazes de liberar Ac contra o Ag usado na imunização. Em seguida, os Ac monoclonais podem ser arquivados em meio de cultura, para serem usados posteriormente.

#### d) O sistema complemento

A interação entre o Ag e a fração Fab da Ig dá origem a diversos eventos que visam a eliminação do agente invasor. A ativação do SC é o mecanismo efetor fundamental desse fenômeno.

O SC compreende um grupo de substâncias do soro, que funcionam como mediadores da resposta imune. Esse sistema basicamente é composto por proteínas, que atuam de forma seqüencial logo após a ativação do primeiro componente (Clq), que irá ativar várias moléculas dos componentes seguintes e, assim, sucessivamente

Existem duas vias totalmente independentes que conduzem a ativação da porção terminal do complemento: a via alternativa e a via clássica. A via alternativa é ativada pela fração C3, na ausência de Ac, portanto, sem a necessidade da resposta imune específica, constituindo um importante mecanismo da imunidade inata. A via clássica é iniciada pela ligação do primeiro componente do complemento (Clq) às porções Fc das moléculas de Ac que tenham se ligado aos Ag, servindo como um mecanismo efetor da imunidade adquirida específica.

A lise de diversos tipos de células, bactérias e vírus, a fagocitose e os efeitos pró-inflamatórios são algumas conseqüências biológicas da ativação do SC.

Resumidamente, a ativação de C1q desencadeia a ativação dos componentes C4, C2 e C3. Inicialmente, Clq promove a quebra de C4 em dois fragmentos C4a e C4b. Alguns fragmentos de C4b se ligam a receptores presentes na membrana celular e a eles se unem o C2. Após essa união, C2 é fragmentado em C2a e C2b. O fragmento C2a se une ao C4b, formando uma nova enzima o C4b2a, o qual tem como substrato a fração C3. Essa fração, ao se ligar ao C4b2a, desdobra-se em dois fragmentos: C3a e C3b. O fragmento C3a cai na circulação e atua como mediador da inflamação (quimiotáxia para neutrófilos, anafilatoxina) enquanto o C3b se une a um receptor na superfície celular, localizado próximo ao C4b2a. Nesse local, forma-se uma nova enzima: C4b2a,3b que atua sobre C5, quebrando-o em C5a e C5b. O fragmento C5a desempenha atividades semelhantes às aquelas desenvolvidas pelo C3a, enquanto o fragmento C5b se combina com frações C6 e C7. Depois de formado, o complexo C5b,6,7 se une à membrana celular, em local próximo ao C3b. Desse modo, na membrana celular se observam complexos C4b,2a,3b,5b,6,7. Sobre eles se unem, seqüencialmente, as frações C8 e C9. Neste estágio ocorre a lise celular.

#### Efeitos biológicos do complemento

As atividades biológicas do complemento podem ser divididas em benéficas e deletérias ao hospedeiro.

As principais atividades **benéficas** compreendem:

1. Destruição de patógenos por citólise;

2. Oponização e promoção de fagocitose de microrganismos;
3. Liberação de mediadores dos mastócitos (anafilatoxinas - C3a, C4a, C5a);
4. Depuração fagocitária dos complexos imunes;
5. Regulação das respostas imunes humorais

A respostas deletérias podem ocorrer se o sistema complemento for:

1. ativado sistematicamente em larga escala (sepse por bactérias Gram- negativas);
2. ativado por uma resposta imune contra tecidos do hospedeiro.

#### e) Consideração Final

A indução da imunidade depende de uma série de fatores que, em conjunto, podem determinar quais tipos de linfócitos serão estimulados e, desse modo, o tipo de resposta a ser desenvolvida. O equilíbrio entre a atividade e a tolerância dos linfócitos é que vai garantir a saúde ou influenciar o curso da doença.

#### O envolvimento do sistema imune na hanseníase

##### Introdução

Os mecanismos pelos quais determinados agentes estimulam o desenvolvimento da resposta imune ainda não se encontram totalmente esclarecidos. O tipo de resposta desencadeada irá depender de vários fatores incluindo natureza, virulência, metabolismo, modo de multiplicação do agente agressor, dose do inóculo e porta de entrada do hospedeiro. Parasitas que se multiplicam extracelularmente ativam principalmente o ramo humoral do sistema imune, e aqueles com multiplicação intracelular ativam a imunidade mediada por células. As principais células envolvidas nesse processo são os linfócitos, fagócitos mononucleares (FMN) e polimorfonucleares (PMN).

A hanseníase é uma das doenças granulomatosas, cujo agente etiológico, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), é um parasita intracelular obrigatório, o que torna a defesa ao agente agressor dependente da imunidade celular. Essa dependência é bem peculiar; pois é a capacidade imune do hospedeiro que irá determinar a sua posição no espectro clínico da doença.

Existe uma forma com resistência alta, denominada hanseníase tuberculóide (HT), que é paucibacilar. As lesões são bem delimitadas, com raros bacilos e os pacientes podem se curar espontaneamente. No lado oposto, encontra-se a forma de baixa resistência, denominada hanseníase virchowiana (HV), que é multibacilar. Apresenta numerosas lesões, mal definidas com excessiva multiplicação de bacilos e disseminação das lesões para vísceras e nervos. Pacientes desse tipo, quando não tratados, pioram progressivamente.

Entre esses dois pólos, existe o grupo da hanseníase dimorfa (HD) que apresenta manifestações clínicas, baciloscópicas e

imunológicas intermediárias; predominando lesões bem delimitadas como na HT e/ou lesões disseminadas da HV, de acordo com o grau de resposta imune ao *M. leprae*. A HI pode adquirir características tuberculóides, denominada hanseníase dimorfa tuberculóide (HDT) ou virchoviana (HDV) ou permanecer Como hanseníase dimorfa dimorfa (HDD), dependendo do potencial da resposta celular do hospedeiro.

A fase inicial da doença é denominada hanseníase indeterminaria (HI) e pode evoluir para uma das formas descritas acima, na dependência da resposta imune do hospedeiro ou curar-se espontaneamente.

### Reação de Mitsuda

A presença de resposta imune pode ser determinada pela reação de Mitsuda. Procurando elementos de auxílio ao diagnóstico da hanseníase, Mitsuda (1919) preparou uma suspensão de material cutâneo proveniente de hansenianos com a forma tuberosa (virchoviana) da moléstia. Essa preparação, contendo bacilos mortos pelo calor, quando injetado por via intradérmica, reagia diferentemente conforme a forma clínica dos pacientes. Hayashi (1933) descreveu com detalhes os procedimentos utilizados para o preparo da suspensão de Mitsuda, bem como os critérios para avaliação clínica da reação.

A partir dos relatos dos dois pesquisadores, vários estudos foram realizados sobre a reação de Mitsuda e, hoje, existe unanimidade no que se refere a positividade da reação, predominantemente na forma HT, sua negatividade na HV e frequentemente no grupo HI). No grupo HT, a reação varia de acordo com o grau de resistência do indivíduo. Assira uma resposta positiva ao Mitsuda é uma indicação de que a evolução será para o tipo HT da doença.

O antígeno utilizado consiste de um Ag bruto, não purificado, preparado a partir de hansenomas obtidos de pacientes bacilíferos. Esse material é processado e, ao final, obtém-se uma suspensão composta de *M. leprae* e restos teciduais do doador. A emulsão tem recebido várias denominações, entre elas, lepromina, lepromina integral, lepromina H, antígeno de Mitsuda, ou Mitsudina. Tecidos de tatus infectados com o *Al. leprae* também têm servido como fonte de bacilos no preparo do antígeno, denominado lepromina A (*armadillo*).

A injeção intradérmica do antígeno de Mitsuda origina duas respostas independentes, conhecidas como reação precoce e reação tardia. A reação precoce ou reação de Fernandez é caracterizada por eritema e induração local 48-72 horas, após a introdução do Ag. São consideradas positivas indurações com diâmetros maiores que 10 mm. Indurações com diâmetros inferiores são consideradas como respostas aos Ag comuns do *M. leprae* e outras micobactérias. Pelo quadro que apresenta, a reação de Fernandez é considerada uma reação de hipersensibilidade tardia, tipo tuberculínica, só se manifestando, portanto, em organismos previamente sensibilizados, mas isso é discutível. A reação tardia ou de Mitsuda processa-se gradualmente

e atinge sua intensidade máxima por volta de 28 dias.

O critério de leitura clínica das duas reações é baseado no diâmetro da induração que ocorre no local quando se injeta 0,1 ml do Ag por via intradérmica, com uma seringa tipo insulina, na face anterior do braço ou antebraço. O critério adotado para a leitura foi formulado em 1948 no Congresso Internacional de Leprologia de Tóquio, como segue:

negativo = ausência de resposta;  
duvidoso = infiltração com diâmetro < 3,0 mm;  
positivo (+) = infiltração com diâmetro entre 3,0 e 5,0 mm;  
positivo (++) = infiltração com diâmetro > 5,0 mm;  
positivo (+++) = infiltração com diâmetro > 10 mm e ulcerado.

A classificação histopatológica da Mitsudina relatado por Bechelli et al., 1959, e Azulay et al., 1960, são coincidentes e apresentam variações de grau com maior ou menor detalhe. Em 1983, Michalany & Michalany publicaram um trabalho minucioso sobre a reação de Mitsuda em adultos sadios não comunicantes de hansenianos, rio qual empregaram a seguinte classificação:

negativo = ausência de infiltrado inflamatório. Bacilos presentes;  
duvidoso = infiltrado inflamatório não granulomatoso. Bacilos raros ou ausentes;  
positivo fraco (+) = infiltrado inflamatório granulomatoso tuberculóide incompleto com células epitelióides, mas sem arranjo folicular. Bacilos raros ou ausentes;  
positivo moderado (++) = infiltrado inflamatório granulomatoso tuberculóide incompleto ou tuberculóide completo, com esboço de arranjo folicular. Bacilos ausentes;  
positivo forte (+++) = infiltrado granulomatoso tuberculóide completo com arranjo folicular. Bacilos ausentes.

Dos muitos trabalhos presentes na literatura, admite-se que a reação de Mitsuda seja específica, manifestando-se em resposta a Ag insolúveis presentes no *M. leprae*. Desse modo, a reação de Mitsuda positiva, tanto em indivíduos sadios como em pacientes paucibacilares, reflete a capacidade do organismo em reagir contra o bacilo. Do mesmo modo, sua negatividade é indicativa da falta de resistência ao parasita.

Em 1953, no 6º Congresso Internacional de Madri, a reação de Mitsuda foi definitivamente incorporada aos critérios de classificação da hanseníase, definindo pacientes HT como Mitsuda positivos, e os HV e a maioria dos HI) como Mitsuda negativos. No grupo HI, a intradermoreação varia de acordo com a capacidade imune do indivíduo. Assim, uma resposta positiva é indicativa de que a evolução clínica será para o tipo HT da doença. Em indivíduos sadios, a frequência de positividade a essa reação aumenta com a idade, chegando a atingir em média 90% dos indivíduos na fase adulta. Contudo, em cerca de 10% da população, ela se apresenta persistentemente negativa.

Por ser a Mitsudina um Ag rudimental; hoje, muitos pes-

quisadores têm se empenhado na obtenção de Ag específicos extraídos do *M. leprae* que possam ser utilizados em testes diagnósticos e na profilaxia da hanseníase. A pesquisa de Ag, recombinantes do *M. leprae* que possam ser utilizados nos testes intradérmicos, é uma das prioridades da Organização Mundial da Saúde (OMS). A obtenção dos Ag permitiria o preparo de grandes quantidades de reagentes, com purificação simples, menor risco de contaminação e padronização mais fácil.

### Alterações da imunidade celular

À semelhança do que ocorre em outros processos infecciosos, cujos agentes são intracelulares obrigatórios, a imunidade celular é um importante mecanismo no controle da infecção pelo *M. leprae*. O comprometimento imune observado na forma HV é específico ao bacilo e, ainda, não se encontra totalmente esclarecido.

Os testes cutâneos são instrumentos importantes para avaliar a capacidade da resposta celular de cada indivíduo. Em hansenianos os testes cutâneos com PPD, candidina, tricofitina e estreptoquinase demonstraram respostas iguais aos controles saudáveis. Entretanto, alguns autores descreveram uma depressão da resposta a esses Ags nos pacientes HV, quando comparados aos grupos controles.

Trabalhando com extrato de *Candida albicans*, Nakayama et al., (1961), demonstraram que pacientes hansenianos respondiam da mesma maneira que controles saudáveis. Entretanto, outros autores encontraram resposta diminuída na HV e HT.

Guinto & Malabay (1962), realizando intradermoreação com tuberculina, encontraram positividade em 47,7% na HV, 78,6% na HT e 81,3% nos controles. A diminuição da resposta nos pacientes HV foi confirmada por alguns autores, embora outros não tenham sido capazes de evidenciar diferenças entre os grupos estudados.

Convit et al. (1971) verificaram que não havia diferenças significativas nas respostas dos pacientes HV e da população normal, quando a intradermoreação de tricofitina era testada. Esses resultados foram confirmados por Mota (1973) e Rea et al. (1976). Contudo, Mendes et al. (1974) descreveram uma diminuição da resposta a esse Ag, quando pacientes HV eram comparados aos controles saudáveis.

A sensibilização por agentes químicos também serviu a muitos investigadores como método para o estudo da imunidade celular. Turk et al. (1969) relataram sensibilização ao dinitrocloro benzeno (DNCB) em todos os pacientes HT estudados e 50% na forma HV Mendes et al. (1974) verificaram depressão de respostas ao DNCB, em ambas as formas polares, enquanto, Rea et al. (1976) não encontraram nenhuma depressão nos HV estudados.

As diferenças, encontradas entre os pesquisadores que estudaram a resposta imune celular na hanseníase, podem ser atribuídas às variantes observadas nos estudos, tais como duração da doença e da quimioterapia, classificação dos pacientes, fatores raciais,

idade, ou, até mesmo, diferenças na metodologia de elaboração dos Ag testados.

### Principais defeitos atribuídos aos macrófagos e linfócitos T na hanseníase

Os estudos envolvendo os possíveis defeitos na capacidade microbicida dos monócitos-macrófagos de pacientes hansenianos apresentam resultados discrepantes.

Ávila & Convit (1970), estudando a capacidade digestiva *in vitro* de macrófagos derivados de monócitos do sangue periférico de pacientes HT e HV, demonstraram que os macrófagos de pacientes 1-IV eram deficientes na sua habilidade em digerir o *M. leprae* quando comparados aos macrófagos de pacientes HT. Segundo os autores, essa inabilidade na lise do bacilo era devida à deficiência em certas enzimas presentes nos lisossomos dos macrófagos de pacientes HV. Esses achados foram contestados por outros pesquisadores que não encontraram diferenças no comportamento *in vitro* de macrófagos obtidos de pacientes HV, quando comparados àqueles obtidos de pacientes HT; com respeito a sua habilidade em digerir o bacilo.

Com relação a pacientes HD, Pisani et al. (1973) demonstraram que seus macrófagos eram hábeis em digerir o *M. leprae*, embora em grau menor do que aquele demonstrado por pacientes HT. Treo & Silva (1963), contudo, não observaram diferenças entre atividade macrofágica de tais pacientes e àquela observada nos pacientes HV.

Os estudos envolvendo os ROI também apresentaram resultados controversos. Sharp & Banerjee (1985) estudaram a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e O<sub>2</sub>; por macrófagos, obtidos de monócitos sanguíneos de pacientes HT e HV e não encontraram diferenças na produção desses metabólitos quando comparados aos indivíduos saudáveis. Assim, sugeriram que os macrófagos dos pacientes hansenianos eram competentes na produção dos ROI. Nathan et al. (1986), porém, relataram que os macrófagos de pacientes HV eram deficientes no metabolismo oxidativo e, conseqüentemente, na função microbicida.

Cabe salientar que o *M. leprae* parece possuir uma capacidade inata para resistir aos efeitos tóxicos dos ROI. Nesse sentido, foi demonstrado que o bacilo possui a enzima superóxido dismutase que, juntamente com o glicolípido fenólico-1 (PGL-1), componente da parede celular, atuam como inibidores do O<sub>2</sub> . Além disso, Chan et al. (1992) demonstraram que a presença do I ipopolissacarídeo da parede celular; a lipoarabinomanana (LAM), promoveria a diminuição da liberação do O<sub>2</sub> - e desativação da retirada do OH<sup>-</sup>. Desse modo, o bacilo estaria bem equipado para lutar contra os metabólitos tóxicos do oxigênio produzidos pelos monócitos-macrófagos.

Com relação aos RNI, Adams et al. (1991), ao estudarem *in vitro* os efeitos do óxido nítrico, produzido por macrófagos murinos ativados, sobre o *M. leprae* verificaram que esse metabólito inibia a multiplicação do bacilo e sugeriram que os RNI se constituiriam em

um possível sistema antimicrobiano de macrófagos ativados contra o *M. leprae*.

Alguns pesquisadores admitem ainda um possível defeito na apresentação antigênica do *M. leprae* aos IT. Os estudos realizados sugerem que, após o processamento do bacilo no interior do macrófago, o epítipo se associaria a diferentes moléculas de classe II do MHC, de modo que os pacientes apresentariam respostas diferentes ao bacilo. Nesse sentido, foi demonstrado uma predominância do antígeno HLA-DR3 nos pacientes HT. Esses estudos, porém, não foram conclusivos. (Mais detalhes sobre o assunto ver em "Imunogenética da Hanseníase").

Quanto à produção de citocinas por macrófagos, tanto a TL-1 como o TNF $\alpha$  parecem desempenhar um importante papel na defesa do hospedeiro e na patogênese das doenças micobacterianas. Watson et al. (1984), ao estudarem a produção de IL-1 por monócitos do sangue periférico de pacientes com hanseníase, verificaram produção deficiente nos pacientes HV. Resultados semelhantes foram encontrados por Ridet et al. (1986). Cabe lembrar que a IL-1 está envolvida na ativação dos LT CD4<sup>+</sup> e que uma produção deficiente compromete o desenvolvimento da resposta imune celular.

A produção de TNF $\alpha$  pelos monócitos sanguíneos na hanseníase foi investigada por Silva & Foss (1989) e Foss et al. (1995). Esses estudos verificaram que pacientes HV exibiam deficiência na produção dessa citocina quando comparados aos HT e aos controles sadios, sugerindo que a depressão da resposta macrofágica está associada à presença do bacilo e/ou de seus componentes.

Silva et al. (1993) demonstraram que o PGL-1 diminui a liberação de IL-1, IL-6 e TNF $\alpha$  em sobrenadante de cultura de células mononucleares estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS), levando à diminuição da atividade macrofágica e, conseqüentemente, favorecendo a multiplicação do bacilo em seu interior.

Alguns pesquisadores têm direcionado seus estudos aos LT e sugerido que a incapacidade dos macrófagos de pacientes HV em destruir o *M. leprae* seria devida à secreção defeituosa de IFN $\gamma$  pelos LT CD4<sup>+</sup>, de modo que os macrófagos não seriam adequadamente ativados.

Dentro desse contexto, existem alguns estudos demonstrando que os LT CD4<sup>+</sup> são deficientes na produção de IL-2, bem como na expressão de receptores para essa linfocina.

Recentemente Mutis et al. (1993), estudando a produção de citocinas por CF do sangue periférico de pacientes hansenianos, encontraram clones desses linfócitos com atividades semelhantes aos LTH1 e TH2. Segundo os autores, nos pacientes HT os bacilos estimulariam os linfócitos TH1 a produzirem altos níveis de IFN $\gamma$ , a linfocina chave na ativação macrofágica, enquanto que nos pacientes HV a estimulação dos LTH2 levaria à produção de níveis elevados de IL-4, a linfocina que atua sobre os LB levando à produção de Ac.

A caracterização da população celular das lesões cutâneas de pacientes com hanseníase, através de método imunohistoquímico, tem demonstrado predomínio de LT CD4<sup>+</sup> nos pacientes HT, em contraste com predomínio de LT CD8<sup>+</sup> com fenótipo supressor em pacientes HV. Desse modo, nas lesões do tipo HT há grande quantidade de IL-2 e IFN / devido ao predomínio de LT CD4<sup>+</sup>, contribuindo para a resistência imunológica do paciente; enquanto que nas lesões HV há aumento de IL-4 que estimula a proliferação de TH2 e produção de níveis elevados de Ac.

A avaliação de subpopulações de LT realizada por Modlin et. al. (1983) demonstrou que nos fragmentos cutâneos da HT as células T presentes no centro do granuloma epitelióide eram CD4<sup>+</sup> e no manto circunjacente, CD8<sup>+</sup>. Na forma V as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> estavam misturadas com histiócitos vacuolados sem definir um manto linfocitário. Para os autores, a disposição entre LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na HT estaria associada à maturação dos monócitos, lise bacilar e resposta de hipersensibilidade tardia. Por outro lado, na IV a distribuição ao acaso de LT CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> poderia sugerir uma não apresentação do Ag às células imunocompetentes, como também supressão na maturação dos monócitos para células epitelióides.

Recentemente, foi observado que as lesões de pacientes HV apresentam grande quantidade de TGF $\beta$ , enquanto que em lesões IT essa citocina não foi encontrada. Cabe salientar que o TGF $\beta$  é um potente inibidor da ativação de macrófagos, inibe a proliferação de LT CD4<sup>+</sup> e pode promover a proliferação de LT CD8<sup>+</sup> conduzindo, desse modo, à depressão da resposta imune celular, característica dos pacientes HV.

Conforme foi exposto, muitos são os defeitos imunológicos apontados pelos pesquisadores para explicar a imunodeficiência que acomete os pacientes HV; cabe salientar, entretanto, que essa deficiência da imunidade celular é específica ao *M. leprae*, de modo que os pacientes HV exibem resposta imune celular para outros microrganismos. Até o momento, os fatores responsáveis pela imunodeficiência específica nos pacientes HV ainda não se encontram totalmente elucidados.

### **Alterações da imunidade humoral**

Apesar do comprovado comprometimento imunológico existente na hanseníase em atividade, a ausência de antígenos comprovadamente específicos do *M. leprae*, tem dificultado o desenvolvimento de provas imunológicas que poderiam auxiliar na constatação da cura.

De maneira geral, alterações sorológicas estão bem documentadas na hanseníase principalmente na forma HV. Mas apesar das inúmeras tentativas, não há, até o momento, provas sorológicas comprovadamente específicas para essa moléstia. A única exceção era até então, a reação de Rubino. Há 70 anos, Miguel C. Rubino, enquanto trabalhava com reação de fixação de complemento para diagnóstico de sífilis, utilizando hemácias formolizadas, notou que

em 800 soros humanos testados havia um que induzia a hemossedimentação rápida e clarificação do sobrenadante. Ele não havia observado esse fenômeno anteriormente, e por isso foi verificar a origem do soro, identificando-o ao de um paciente hanseniano. Rubino, então, dedicou seu tempo em estudar a natureza da reação.

Até o momento, a natureza e os mecanismos da reação têm sido extensivamente estudados, mas não estão de todo esclarecidos. Apesar da especificidade apresentada, essa reação é pouco sensível, ou seja, apenas se apresenta positiva quando o diagnóstico já está definido e, mesmo nesse caso, em apenas uma parcela da população hanseniana (55,5% na HV, 21,3% HI) e 8,1% HT).

A reação de Rubino consiste na mistura do soro e de uma suspensão de hemácias de carneiro formolizadas incubadas por uma hora à 37° C. A aglutino-sedimentação das hemácias, com consequente clarificação do sobrenadante, indica a positividade da prova.

Estudando a especificidade da reação, Rubino observou que soro de pacientes portadores de outras moléstias, que não a hanseníase, poderia aglutino sedimentar hemácias naturais e em alguns casos também as hemácias formolizadas. Desse modo, estabeleceu que a aglutinação das hemácias, observada pela ação de soro de pacientes portadores de outras patologias era devido a hetero-aglutininas, enquanto que na hanseníase, as aglutininas atuavam especificamente sobre o sistema formolado.

O fator específico responsável pela reação (Fator Rubino), foi recentemente identificado como uma imunoglobulina do isotipo M, isolado de *um pool* de soro de pacientes HV, cujo nível de IgM eram mais alto do que os dos indivíduos normais. A obtenção do fator Rubino/IgM purificado permitiu demonstrar a necessidade de um co-fator presente, até mesmo em soro humano normal, para a reação se processar. As investigações demonstraram que o fator Rubino/ IgM é um anticorpo anti-fosfolípido dependente de  $\beta$ 2-glicoproteína 1. O componente eritrocítico ao qual o fator Rubino/TgM e o co-fator  $\beta$ 2-glicoproteína 1 se ligam é um fosfolípido. Portanto, a interação desses três componentes desencadeiam a sedimentação acelerada da hemácia.

Para Panunto-Castelo (1998), a especificidade da reação de Rubino não é absoluta para hanseníase como era até hoje definida, ampliando-se para todo grupo de pacientes com altos títulos de anticorpos anti-fosfolípidios dependentes de  $\beta$ 2-glicoproteína 1. Isso foi demonstrado em 45% das soros testados de paciente com altos níveis de anticorpos anti-cardiolipina que apresentaram reação positiva. Devido a sua baixa sensibilidade e ao fato de apresentar-se positiva somente quando o diagnóstico de hanseníase já estava implícito, essas características limitam sua aplicabilidade como auxílio diagnóstico.

Com relação aos aspectos sorológicos inespecíficos, a hanseníase apresenta uma farta documentação, particularmente referente a forma HV Distúrbios dos padrões eletroforéticos, elevação dos níveis de imunoglobulinas séricas e auto-anticorpos, são achados comuns nessa moléstia.

o estudo das proteínas séricas de pacientes HV em atividade tem demonstrado resultados divergentes, embora a maioria dos autores concorde que, em tais pacientes, é freqüente o encontro de hiper gamaglobulinemia associada à diminuição da fração albumínica, quadro esse observado nas doenças inflamatórias crônicas.

O eletroproteinograma é uma prova inespecífica. Pelo fato da hanseníase ser uma moléstia crônica que pode deixar seqüelas e que incide com maior freqüência em populações de baixo nível sócio- econômico, poderiam existir muitos outros fatores responsáveis pelo desvio protéico apresentado pelos pacientes, além daquele representado pela doença em si.

A designação de fator reumatóide corresponde aos anticorpos imunologicamente semelhantes à IgM, dirigidos contra determinantes antigênicos da IgG, alterados pelo calor ou pela formação de complexos imunes.

Schubart et al (1959) foram os primeiros pesquisadores a descreverem a presença do fator reumatóide no soro de pacientes hansenianos. De acordo com seus dados, a freqüência desse auto- anticorpo nessa moléstia não se encontra muito diferente daquela observada em soros de pacientes reumatóides. A partir desse estudo, vários pesquisadores relataram o encontro do fator no soro de pacientes hansenianos, principalmente no pólo V. A metodologia empregada pelos autores, para a detecção de fator reumatóide, sugere a presença de dois elementos semelhantes ao fator reumatóide na hanseníase: um que reage com a Ig humana que reveste a partícula de látex (prova de látex) e, outra, com afinidade para a Ig de coelho, com a qual as hemácias de carneiro são revestidas, na prova de Waller - Rose.

Outra alteração sorológica observada diz respeito ao acentuado aumento de produção das proteínas da fase aguda da inflamação, como a proteína C reativa (PCR), sintetizadas pelos hepatócitos, seguido ao estímulo inflamatório. Evidências sugerem que a produção dessa proteína, em nível hepático, seria induzido por citocinas, entre elas a TL-1, TNF e IL-6 ou IL-1 e IL-6.

A concentração sérica de PCR pode se elevar de níveis inferiores a 1,0 mg/dl até maiores que 400 mg/dl, nas primeiras 24 - 48 horas da reação inflamatória. Pouco se sabe sobre a participação de PCR nas reações imunológicas presentes na hanseníase. E conhecido que a concentração de PCR é elevada em doenças infecciosas. Na HV, particularmente nos estados reacionais, está consideravelmente aumentada.

Vale salientar os resultados relatados por Foss em 1991, que confirmam os já descritos com relação a elevada concentração sérica de PCR em doentes HV reacionais e não reacionais. Outro achado interessante, observado pela pesquisadora, é a correlação positiva entre as concentrações de PCR e TNF $\alpha$  nos HV reacionais, mostrando que quando a concentração de TNF aumenta ocorre aumento de PCR.

A ocorrência de auto-anticorpos, na hanseníase, é um dado estabelecido, sendo que as divergências entre os diversos pesquisadores se restringem apenas à frequência em que eles ocorrem.

Os auto-anticorpos, na hanseníase, aparecem em diferentes padrões que variam de acordo com a população estudada, os métodos usados e os períodos em que foram avaliados. Diversos auto-anticorpos têm sido descritos, principalmente na HV; dentre eles o fator reumatóide, fator anti-nuclear; anti-tiroglobulina, anti-músculo liso, anti-cardiolipina, anti-colágeno I e II, bem como falsa reação positiva para sífilis, que indicam a presença de anticorpos antifosfolípido e/ou uma reação cruzada com componentes antigênicos da micobactéria.

O VDRL (*Venerai Disease Research Laboratory*) é uma prova de microfloculação que utiliza como substrato antigênico um componente da membrana das mitocôndrias denominado cardiolipina. Couro esse antígeno é encontrado nas membranas mitocôndrias de muitos tecidos de mamíferos bem como em vários microrganismos, essa reação pode apresentar-se positiva em outras doenças que não a sífilis. Na hanseníase, a prova do VDRL apresenta-se positiva em cerca de 30% dos pacientes V estudados.

Na hanseníase, particularmente nas formas multibacilíferas, uma outra alteração detectada é a elevação dos níveis séricos de imunoglobulinas das classes G, M e A. O aumento da IgG sérica é condizente com o observado em outras infecções crônicas, nas quais o sistema imunológico se encontra sujeito a estímulo constante e por tempo prolongado. Com relação a IgM, os autores não apresentam uma explicação concorde. Para Lim e Fusaro (1968), esse aumento poderia ser devido à contínua multiplicação bacilar e à reação, por parte do hospedeiro, frente a uma grande concentração antigênica. De acordo com Sagher et al. (1971), o grande número de bacilos presentes nas mucosas, poderiam ser o responsável pelo aumento de IgA.

A obtenção de antígenos, para testes sorológicos sensíveis e específicos, tem sido, há muitos anos, uma meta árdua para os pesquisadores, por ser o *M. leprae* uma micobactéria não cultivável. Os primeiros experimentos foram limitados pela pequena quantidade de bacilos obtidos de hansenomas humanos. Com a descoberta do tatu como animal capaz de apresentar disseminação bacilar, ele serviu de fonte para a obtenção de grande quantidade de *M. leprae* e, com os avanços tecnológicos na área da imunologia, tornou-se possível o desenvolvimento de métodos sorológicos mais sensíveis e específicos.

A caracterização de anticorpos anti-micobacterianos em hanseníase iniciou-se em 1906, quando Eitner demonstrou que preparações antigênicas obtidas a partir de hansenomas poderiam fixar o sistema complemento quando na presença de soros de pacientes hansenianos. A partir desse resultado e, empregando outras preparações antigênicas, pôde-se demonstrar que o soro de pacientes hansenianos exibiam uma boa quantidade de Ac, principalmente na V e que tais Ac reagiam cruzadamente com outras micobactérias, que não o *M. leprae*. Nesse sentido, as técnicas que se seguiram à de fixação de complemento, precisaram incluir em sua metodologia a

absorção dos soros hansenianos com outras micobactérias. Assim se sucedeu com a prova de imunofluorescência indireta (FLA-Abs) em que foi incluída uma etapa preliminar de absorção dos soros a serem testados com *M. bovis* cepa BCG e *M. vaccae*. Contudo, apenas alguns dos Ac que reagem cruzadamente podem ser removidos por absorção, de modo que tais provas não foram totalmente aceitas como específicas para a infecção hanseniana.

Um dos mecanismos de evasão das bactérias é a sua capacidade de resistir à eliminação no interior dos fagócitos mononucleares. A composição química da parede das micobactérias é complexa e muito importante na imunogenicidade e patogenicidade. Recentemente, estudos sobre os antígenos da parede do *M. leprae* têm caracterizado certas estruturas que fazem parte da cápsula lipídica que o envolve.

O PGL-1 é constituído de um núcleo lipídico comum, ligado a uma porção trissacarídica (carboidrato) só encontrado no *M. leprae*. Constitui cerca de 2% da massa total bacteriana, podendo ser encontrado em grandes quantidades em tecidos infectados humanos e de tatus. Caracteriza-se por ser um Ag específico do bacilo; estimular uma forte resposta humoral em pacientes V; funcionar como *scavenger* (removedor) dos ROI, como, também, ser um dos ligantes responsáveis pela fagocitose do *M. leprae*, isto é, o PGL-1 se fixa ao C3 do complemento que, por sua vez, irá se ligar ao receptor C3 sobre a célula fagocitária.

O fosfatidilinositol manose (PDIM) e o lipomanana (LM), que também são componentes da parede micobacteriana, podem suprimir a ativação dos macrófagos induzidos pelo IFN $\gamma$ .

LAM é outro constituinte da parede celular das micobactérias, inclusive do *M. leprae*, que desempenha um papel importante nas alterações da resposta celular e na atividade funcional dos macrófagos na hanseníase. Foi demonstrado *in vitro* que Ag solúveis do IAM inibem a proliferação e resposta dos clones de LT CD4+ de indivíduos normais e hansenianos. Além disso, o IAM pode diminuir a capacidade microbicida de macrófagos humanos e murinos quando ativados pelo IFN $\gamma$  e suprimir a apresentação de moléculas de classe Ia do MHC em macrófagos murinos. As respostas dos Ac humanos para um epítipo do LAM têm sido medidas por diversas técnicas, sendo uma delas a técnica de inibição competitiva empregando Ac monoclonais marcados e através da técnica de ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*).

Em contraste com outras bactérias, o *M. leprae* tem poucas proteínas superficiais expostas. Contudo, devido ao processamento intracelular e à apresentação dos Ag proteicos do bacilo, o ser humano produz Ac para várias proteínas da micobactéria. Essas proteínas são denominadas, de acordo com suas massas moleculares, de 12 kDa, 15-16 kDa, 18 kDa, 22 kDa, 27-28 kDa, 33 kDa, 35 kDa, 36 kDa, 45-48 kDa, 65 kDa e 70 kDa.

Os métodos utilizados para sua detecção são: ELISA, imunoprecipitação, *western immunoblotting* e imunoperoxidase em gel de poliácridamida.

Hunter e Bremnan (1981) caracterizaram um PGL-1 espécie-específico de fígado de tatus infectados pelo *M. leprae*. Os estudos imunológicos, que se seguiram após essa descoberta, confirmaram sua especificidade e demonstraram a presença de Ac dirigidos contra esse Ag no soro de pacientes hansenianos.

A análise de determinantes antigênicos presentes nesse glicolípido revelou que a imunodominância encontrava-se no resíduo terminal, 3-6-Di-O-Inetil-D-glicopiranosil. Esse fato permitiu a produção de Ag sintéticos altamente sensíveis e portanto passíveis de serem utilizados no diagnóstico sorológico da hanseníase.

Brett et al., em 1983, sugeriram que a técnica de ELISA, imunoensaio enzimático, é a mais adequada para se demonstrar a presença de Ac contra o PGL-1, e foi observado que os Ac correspondentes ao Ag eram predominantemente IgM. Os níveis séricos de tais Ac estão diretamente relacionados à carga antigênica do hospedeiro.

Young et al (1984) pré incubaram o soro dos hansenianos com o PGL-1 e mediram a atividade das IgM desses soros e verificaram que a atividade havia reduzido em 90%, provando que a resposta imune frente a este Ag é predominantemente IgM.

Em 1984, Schewerer et al. demonstraram que os níveis de IgM diminuíram de acordo com a diminuição do índice baciloscópico. Entretanto, no mesmo estudo, os autores observaram que alguns doentes com índice baciloscópico baixo apresentaram altos títulos de Ac. Esse achado poderia sugerir a presença de doença ativa em outras regiões, que não a pele, como nervos e vísceras (fígado, baço e testículos), consistindo no que foi denominado de "persistência bacteriana".

É importante lembrar que o PGL-1 é encontrado em quantidades muito grande em tecidos infectados, chegando, no caso da forma V, a atingir 400 mg/gr de tecido.

No decorrer da infecção, o ser humano responde a 11 ou mais proteínas extraídas do bacilo de Hansen, com uma frequência de Ac significativamente menor comparado aos Ac dirigidos contra PGL-1 ou IAM. Isso ocorre porque as proteínas são Ag solúveis, por= tanto, facilmente degradadas pelos macrófagos, enquanto que as outras duas moléculas lipídicas são provavelmente resistente à degradação lisossomal, persistindo nos tecidos.

Tem sido avaliado detalhadamente a questão da utilidade da determinação de Ac contra os Ag específicos do *M. leprae* no diagnóstico da hanseníase na fase sub clínica ou no monitoramento da quimioterapia. Parece que, para o diagnóstico sorológico, com testes imunológicos baseados, quer no, glicolípido fenólico ou nos epítomos espécie-específico das proteínas de 35-36 kDa, são mais eficientes na infecção e doença dos multibacilares do que nos paucibacilares.

Com respeito ao monitoramento da quimioterapia na hanseníase, os níveis de Ac para os Ag dos glicolípídios fenólicos, LAM e para os epítomos espécie-específico da proteína de 35 kDa, tem-se encontrado um declínio com o tratamento nos pacientes

multibacilares. Parece que, nos pacientes seguidos seriadamente, devem-se relacionar com a redução do índice baciloscópico e assim fornecer um resultado confirmatório útil. Mas, mesmo assim, existem variações, além do que a determinação do índice baciloscópico é uma técnica sujeita a várias limitações.

Muitos Ag da parede do *M. leprae* pertencem a uma família de moléculas chamadas de proteínas de choque térmico (*heat shock protein - hsp*).

As micobactérias fagocitadas pelos macrófagos sofrem a ação de enzimas e secretam quantidades elevadas de lisp. Muitas dessas proteínas são Ag imunodominantes, como a hsp de 65 kDa.

Essa família de proteínas de choque térmico estão presentes nas células procarióticas e humanas e são induzidas em resposta ao *stress* celular. Elas são classificadas pelo peso molecular e desempenham suas funções celulares normais em associação com outras proteínas influenciando-as funcionalmente. As proteínas hsp 65 e hsp70 atuam no desdobramento e dobramento de proteínas e na reunião de complexos oligoméricos protéicos. Em adição, a hsp70 está envolvida na translocação e apresentação do Ag. Durante as condições de *stress*, tais como, temperatura elevada, exposição a radicais livres e pH extremos, essas funções vêm à tona e são necessárias para a sobrevivência da célula. Não surpreendentemente, no hospedeiro em condições de *stress*, os microrganismos produzem proteínas de choque térmico e, por isso, elas são com frequência o alvo antigenico dominante para a imunidade celular e humoral.

Em indivíduos infectados pelo *M. leprae*, tem-se mostrado que as proteínas lisp 65, 70 e 10 são importantes na produção de uma resposta imano celular forte e em gerar uma memória imunológica. A proteína lisp 65 foi detectada há muito tempo, tanto no *Al. leprae* como no *Mycobacterium tuberculosis*, constituindo o Ag mais potente dessas micobactéria (Ag imunodominantes). Portanto, no soro de pacientes com tuberculose, ou no soro de pacientes com hanseníase e ou naqueles indivíduos vacinados com BCG, encontram-se Ac contra essas proteínas ou T específicas a essas proteínas.

Pesquisadores, estudando a interação do sistema imune com essas moléculas de stress, no caso a lisp 65 do *M. tuberculosis*, verificaram que o macrófago funciona como célula apresentadora dessa proteína, apresentando-a tanto para T CD4+ e como para LT CD8+. Portanto, todo o sistema imunológico é estimulado a induzir uma resposta imune contra a hsp 65 kDa.

Com um bom mapeamento dos epítomos das proteínas de choque e dos respectivos receptores dos II, será possível entender detalhadamente a resposta imune frente à hanseníase e, principalmente, promover um adequado direcionamento no desenvolvimento de vacinas na hanseníase.

## Surtos reacionais

A ocorrência de surtos reacionais, provocados pela resposta imunológica exacerbada do hospedeiro infectado, consiste em um dos maiores problemas encontrados durante a evolução da doença. Os episódios reacionais podem ocorrer ao longo do curso natural da hanseníase, ou durante e após o tratamento. Essa resposta exacerbada pode provocar dois tipos de reações conhecidas como reação reversa (RR) e eritema nodoso hansênico (ENH)

### a) Eritema Nodoso Hansênico

O Eritema Nodoso Hansênico ou reação tipo 2 (corresponde à reação de hipersensibilidade tipo III de Gell & Coombs) é um episódio reacional verificado em pacientes hansenianos do pólo V (ocasionalmente do grupo DV). Esse epifenômeno pode ser desencadeado pela quimioterapia, infecções bacterianas, fúngicas ou virais, vacinação, gravidez ou estresse. Caracteriza-se pelo aparecimento de focos de inflamação aguda instalados ao longo dos granulomas virchovianos, podendo haver comprometimento inflamatório intenso de vasos do derma profundo e tecido celular subcutâneo.

Estudos iniciais sobre o ENH sugeriram que os mecanismos envolvidos na sua patogênese seriam semelhantes aos da reação descrita por Arthus em 1903. Nesse tipo de reação, Ig formam complexos com Ag, depositam-se em vários locais do organismo e geram uma série de eventos que resultam em lesão tecidual. Embora alguns trabalhos tenham conseguido demonstrar depósitos de Ig e frações do complemento nas lesões reacionais, não existe uniformidade nos resultados obtidos pelos que investigam essa área.

Wemambu et. al. (1969), avaliando a presença de Ig e frações do complemento em fragmentos teciduais de ENH, demonstraram depósitos fluorescentes de IgG e complemento localizados perivascularmente em áreas infiltradas por PMN. De acordo com os autores, os resultados foram compatíveis com a hipótese do ENH estar vinculado a mecanismos semelhantes àqueles verificados experimentalmente por Arthus.

Mshana et. al. (1982a), utilizando Ac monoclonais, investigaram a relação CD4+/CD8+ de T circulantes em pacientes HV com e sem ENH. Nesse estudo, pacientes sem ENH apresentaram aumento de LT CD8+ e ligeira diminuição na porcentagem de T CD4+. Por outro lado, alguns pacientes reacionais apresentaram diminuição significativa de LT CD8+ e aumento de CD4+.

Mshana (1982b), insistindo nesse tópico, enfocou que os fatores conhecidos por precipitar o ENH são muitos e variáveis. Citou, particularmente, a quimioterapia, sugerindo que o aumento da incidência da reação em pacientes tratados não seria devido somente à liberação de Ag, mas poderia estar relacionado a distúrbios nas subpopulações de LT e à capacidade individual do paciente em manifestar essas alterações. Propôs que a fase de iniciação do ENH seria devido a este desequilíbrio, caracterizando-se pela diminuição de ET CD8+.

Ridley & Ridley (1983), utilizando o método de imunoperoxidase, pesquisaram a presença de Ag bacterianos e vários fatores imunológicos em lesões cutâneas de pacientes com ENH. Verificaram que no centro da lesão existia desintegração de macrófagos e liberação de Ag bacterianos que se combinavam inicialmente com IgM, posteriormente com IgG e estavam associados aos componentes C1q, C3c, C3d e C4 do sistema complemento. Os complexos foram observados tanto extra como intracelularmente em neutrófilos e macrófagos. Para os autores, os resultados sugeriram ser o ENH um fenômeno ocasionado por imunocomplexos, que ocorreria no local da ruptura de pequenos granulomas virchovianos. Sugeriram, também, que os complexos seriam extravasculares, de modo que a patogênese do ENH diferiria do clássico fenômeno descrito por Arthus.

Nogueira et al. (1995) investigaram a participação dos imunocomplexos na reação de ENH, através de técnicas histopatológicas de rotina em associação com a técnica de imunofluorescência em fragmentos teciduais de pacientes hansenianos reacionais e não reacionais. Os resultados demonstraram depósitos fluorescentes de IgM (8%), C3c (40%) e C1q (44%) em vasos do derma profundo e tecido celular subcutâneo, como também, na zona de membrana basal da junção dermo epidérmica, em áreas reacionais. Para os autores, a presença de imunocomplexos nos Vasos em correspondência com alterações vistas sob a forma de vasculites sugeriram envolvimento de imunocomplexos na patogênese do ENH, embora o mecanismo de participação desses elementos continuassem incertos. Nos fragmentos cutâneos livres de reação, os investigadores observaram depósitos de C3c e C1q (15%), restritos apenas à zona de membrana basal, fato interpretado como resultante da reatividade cruzada entre Ags do *M. leprae* e componentes da membrana basal da epiderme.

O ENH pode ser caracterizado como uma resposta tipo TH2, apresentando aumento da população de LT CD8+ supressor e síntese elevada de IL-4, IL-5, IL-6, IL-8 e IL-10. Provavelmente a subpopulação TH2 aumenta a produção de Ig sintetizada pelos LB, resultando em resposta humoral exacerbada provocando lesão tecidual.

Sarno et al. (1991) observaram níveis elevados de TNF $\alpha$  e IL-1 em hansenianos reacionais (50%). Por outro lado, Foss et al. (1993) relataram aumento da produção de TNF $\alpha$ , associado com elevação dos níveis de PCR. Para as autoras, a citocina inflamatória TNF $\alpha$  poderia atuar estimulando a reação inflamatória aguda.

Sampaio et al. (1991) verificaram níveis séricos elevados de TNF $\alpha$  e sugeriram que durante a reação inflamatória há ativação macrófágica e que a supressão da resposta observada fora do surto reacional não estaria associada à incapacidade do macrófago em processar o bacilo e liberar TNF $\alpha$ . Segundo os autores, o tratamento dos pacientes com talidomida inibiria a produção dessa citocina.

## b) Reação Reversa

A reação reversa, classicamente conhecida como reação tipo 1 (corresponde a reação de hipersensibilidade tipo IV de Gell Coombs, 1963), é causada por uma mudança abrupta na resposta celular do hospedeiro frente ao *M. leprae*. Pode ser representada por uma reação de melhora (*upgrading*), quando a resposta celular do hospedeiro consegue eliminar o bacilo, mas ocorre freqüentemente grandes danos nos tecidos e nervos. Por outro lado, existe a reação de piora (*dowgrading*), quando o bacilo não é morto porque a resposta celular é dirigida contra determinantes antigênicos irrelevantes para a sobrevivência do *M. leprae* que continua a se multiplicar. Nesse caso, ocorre o mesmo dano tecidual porque os mecanismos imunes envolvidos são os mesmos.

Estudos imunológicos têm demonstrado que a RR é similar ao padrão TH1, com aumento seletivo de LT CD8+ citotóxico, IL-1 $\beta$ , IL-2, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$  e, diminuição de IL-4, IL-5 e IL-10.

## Conclusões

Segundo Terencio de las Aguas et al. (1999), a hanseníase tem-se constituído um paradigma no estudo da imunologia clínica. O *M. leprae* apresenta baixa patogenicidade e os sinais clínicos da doença são quase exclusivamente devido às respostas imunes e ao quadro inflamatório do paciente. Também, o bacilo é bem adaptado ao homem, com epítomos comuns com outras micobactérias. A composição de sua membrana o protege muito bem dos mecanismos de defesa do hospedeiro

A hanseníase apresenta-se com imano deficiências parciais e totais que afetam a resposta celular e não existe, até o momento, nenhuma explicação satisfatória sobre a natureza e a patogenia desse déficit. Existe, principalmente, na forma H\; uma grande alteração nas secreções das citocinas que irá repercutir sobre a ativação linfocitária e as subpopulações de LT. Assim, na HV predomina o padrão TH 1 e na HT o padrão TH2.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, L.B. et al. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J. Immunol.*, v. 147, p.1642-6, 1991.
- ARTHUS, M. Injections répétées de serum de cheval chez la lapin. *Compt. rend soc. Biol.*, v.55, p.817, 1903.
- ÁVILA, J.L., CONVIT, J. Studies on cellular immunity in leprosy I. Lysosomal enzymes. *Int. J. Leprosy.*, v.38, p.359-64, 1970.
- AZULAY R.D. et al. Comparation of macroscopic readings and microscopic findings of the lepromin reaction. *Int. J. Leprosy*, v.28, p.38-43, 1960.
- BEHELLI, L.M., RATH DE SOUZA, P., QUAGLIATO, R. Correlação entre os resultados da leitura clínica e do exame histopatológico da reação de Mitsuda *Rev. bras. leprol.*, v.27, p.172-82, 1959.
- BRETT, S.J. et al. Serological activity of characteristic phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* in sera from patients with leprosy and tuberculosis. *Clinical exp. immunol.*, v.52, p.271-79, 1983.
- CHAN, J. et al. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. exp. Med.*, v.175, p.1111-22, 1992.
- CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 6, Madrid, 1953. *Memória...* Madrid: Asociacion Internacional de la Lepra, 1953. p.1344.
- CONVIT, J., PINARD, M.E., ROJAS, EA. Some considerations regarding the immunology of leprosy. *Int. J. Leprosy*, v.39, p.556-64, 1971.
- FOSS, N. T. *Protína C reativa e fator de necrose tumoral na hanseníase*. Ribeirão Preto, 1991. Tese (Livre Docência ). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.
- FOSS, N.T., OLIVEIRA, E.B., SINA, C.L. Correlation between TNF production, invrease of plasma-C reactive protein level and supressor of t lymphocyte response to Concanavalin A during erythema nodosum leprosum. *Int. J. Leprosy*, v.61, p.21826, 1993.
- FOSS, N.T., OLIVEIRA, M.A.S., SILVA, C.L. Avaliação da atividade macrofágica na hanseníase virchowiana e tuberculóide. *Hansen. Int.*, v. 20, p. 5-10, 1995.
- GELL, P.G.H., COOMBS, R.R.A. *Clinical aspects of immunology*. Oxford: Blackwell, 1963.
- GUINTO, R.S., MALABAY, M.C. A note on the tuberculin in reactions in leprosy. *Int. J. Leprosy*, v.30, p.278-83, 1962.
- HAYASHI, Y On a pure culture of leprosy bacilli and skin reaction by means of the pure culture suspensions. *J. Bacteriol.*, v.272, p.51-3, 1918. (republicado em: *Int. J. Leprosy*, v. 1, p. 31-8, 1933).
- LIM, S. D., FUSARO, R. M. Leprosy IV. The quantitation of immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) in leprosy sera. *Int. J. Leprosy*, v.3, p.144-53, 1968.
- MENDES, E. et al. Cell-mediated immunity in leprosy and transfer of delayed hypersensitivity reactions. *J. allerg. clin.immunol.*, v.53, p.223-9, 1974.
- MICHALANY, N.S., MICHALANY, J. Histopatologia da reação de Mitsuda em adultos sadios não comunicantes de hansenianos. *Hansen. Int.*, v.8, p.105-23, 1983.

- MITSUDA, K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprous nodules. *Jap. j. dermatol. urol.*, v.19, p.698-708, 1919. (republicado em *Int. J. Leprosy*, v.21, p.347-58, 1953).
- MODLIN, R.L. et al. In situ demonstration of lymphocytes in granulomatous inflammation: leprosy rhinoscleroma and sarcoidosis. *Clin. exp. immunol.*, '51, p.430-8, 1983.
- MOTA, N.G.S. *Comportamento de provas cutâneas para avaliação da imunidade celular de pacientes com hanseníase virchoviana*. Botucatu, 1973. Tese. Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- MSHANA, R.N. et al. Thymus dependent lymphocytes in leprosy. I. T lymphocyte subpopulations defined by monoclonal antibodies. *Int. J. Leprosy*, v50, p.291-6, 1982a.
- MSHANA, R.N. Hypothesis: erythema nodosum leprosum is precipitated by imbalance of HT lymphocytes. *Leprosy Rev.*, v.53, p.1-7, 19821.
- MUTLS, T. et al. Analysis of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive T cells. *J. immunol.*, v.150, p.4641-51, 1993.
- NAKAYAMA, S., KOSAKA, T., ITO, M. Study on bacteria examined in leprosy patients. I. an isolation of *Candida* from leprosy patients. *Ann. Rep. NIL Res.*, v.7, p.30-1, 1961.
- NATHAN, C.F. et al. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon gamma in patients with lepromatous leprosy *Neu. Engl. j. med.*, v.315, p.6-15, 1986.
- NOGUEIRA, M.E.S., FLEURY, R.N., ARRUDA, M.S.P. Eritema nodoso hanseníco: análise comparativa do quadro histopatológico pelas técnicas de rotina e imunofluorescência. *Hansen. Int.*, v.20, p.11-8, 1995.
- PANUNTO-CASTELO, A. *Anticorpos IgM anti fosfolipídicos, dependentes de h2 glicoproteína 1, determinam a positividade da reação de Rubino na hanseníase. A quebra do paradigma da especificidade absoluta*. Ribeirão Preto, 1998. Tese. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina.
- PISANI, R.C.B., BEIGUELMAN, B., OPROMOLLA, D.VA. *In vitro* behavior of blood derived macrophages against killed *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Leprosy*, v.41, p.14-24, 1973.
- REA, T.H. et al. Immunologic responses in patients with lepromatous leprosy. *Arch. dermatol.*, v.112, p.791-800, 1976.
- RIDEL, P.R. et al. Interleukin-1 released by blood monocyte-derived macrophages from patients with leprosy. *Infect. immun.*, v.52, p.303-8, 1986.
- RIDLEY, M.J., RIDLEY, D.S. The immunopathology of erythema nodosum leprosum: the role of extravascular complexes. *Leprosy Rev.*, v.54, p.95-107, 1983.
- RUBINO, M. C. Nueva reacción serológica de la lepra. *Rev. méd. Uruguay*, v.29, p.143-55, 1926.
- SAGHER, F et al. Complement and immunoglobulin determinations in leprosy and lepra reaction. *Int. J. Leprosy*, v.39, p.541-53, 1971.
- SAMPAIO, E.P. et al. Thalidomide selectively inhibits tumor necrosis factor alpha production by stimulated human monocytes. *J. ex. Med.*, v.173, p.699-703, 1991.
- SARNO, E.N. et al. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin. exp. immunol.*, v.84, p.103-8, 1991.
- SCHUBART, A.F, COHEN, A.S., CALKINS, E. Latex fixation test in rheumatoid arthritis. Clinical significance of a thermolabi inhibition. *New Engl. j. med.*, v.261, p.363-68, 1959.
- SCHWERER, B. et al. IgM antibodies against phenolic glycolipid 1 from *Mycobacterium leprae* in leprosy sera: relationship to bacterial index and erythema nodosum leprosum. *Acta leprol. (Geneve)*, v.2, p.395-402, 1984.
- SHARP, A.K., BANFRJFE, D.K. Hydrogen peroxide and superoxide production by peripheral blood monocytes in leprosy. *Clin exp. immunol.*, v.60, p.203-6, 1985.
- SILVA, C. L., FACCIOLI, L.H., FOSS, N.T. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-T of *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Leprosy.*, v.61, p.107-8, 1993.
- SILVVA, C.L., FOSS, N.T. Tumor necrosis factor in leprosy patients. *J. infect. Dis.*, v.159, p.787-9, 1989.
- TERENCIO DE LAS AGUAS, J. *La Lepra: Parado, Presente y Futuro*. Valencia: Generalitat Valenciana, 1999.
- TREO, M.M., SILVA, C.O. Comportamento do *Mycobacterium leprae* in vitro em sangue total ou plasma de leprosos de diferentes formas clínicas. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 8. Rio de Janeiro, 1963. *Anais*, 1963. v3, p.484-94.
- TURK, J.L. et al. Cell mediated immunity in patients with leprosy. *Lancet*, v.2, p. 243-246, 1969.
- WATSON, S. et al. Interleukin 1 production by peripheral blood mononuclear cells from leprosy patients. *Infect. immun.*, v.45, p.787-9, 1984.
- WEMAMBU, S.N, et al. Erythema nodosum leprosum: clinical

manifestation of the Arthus phenomenon. *Lancet*, v.2, p.933-5, 1969.

YOUNG, D. B. et al. Humans respond predominantly with IgM immunoglobulin to the species specific glycolipid of *Mycobacterium leprae*. *J. infect. dis.*, v.149, p.870-3, 1984.

## BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A.K., MURPHY, K.M., SHER, A. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, v.383, p.787-93, 1996.

ABBAS, K.A., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. *Cellular and Molecular Immunology*. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1997. p.222; 313.

ABE, M; CHININE, S., HIRAKO, R. Reumatoid-factor-like substance and antistreptolysin O antibody in leprosy serum. *Int. J. Leprosy*, v.35, p.336-44, 1967.

ABE, M. et al. Fluorescent leprosy antibody absorption (FLA-ABS) test for detecting subclinical infection with *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Leprosy*, v.48, p.109-19, 1980.

ADAMS, E. et al. T cell reactivity to the purified mycobacterial antigens p65 and p70 in leprosy patients and their household contacts. *Clin. exp. immunol.*, v.80, p.206-212, 1990.

ARNOLDI, J., GERDES, J., FLAD, H.D. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. *Am. j. pathol.*, v.137, p.749-53, 1990.

ARRUDA, M.S.P. et al. Reação de Rubino. Critério de branqueamento para pacientes virchovianos. *Med Cut. I L.A.*, v.11, p.423-30, 1983.

AZULAY, K.D. et al. Comparison of macroscopic readings and microscopic findings of the lepromin reaction. *Int. J. Leprosy*, v.28, p.38-43, 1960.

BALOW, S. P., BUNEL, J., MACINTYRE, S. S. Specific binding of human c-reactive protein to human monocytes in vitro. *J Immunol.*, v.142, p.2078-2113, 1989.

BRASIL, M.T.L.R.F. et al. Aplicação do teste ELISA anti PGL-1 em lo caridade com alta endemicidade da hanseníase, na região norte do Estado de São Paulo. *Hansen. Int.*, v.23, p.35-48, 1998.

BRENNAN, P.J. *Mycobacterium leprae*: the significance of our knowledge of its composition and antigenicity. *Hansen. Int.*, p. 103-10, 1998. (Número especial).

CENCI, E. et al. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur j. immunol.*, v.23, p.1034-8, 1993.

de-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur j. immunol.*, v.23, p.1034-8, 1993.

CHAMPSI, J., YOUNG, L.S., BERMUDEZ, L.E. Production of TNF $\alpha$ , IL-6 and TGF $\beta$ , and expression of receptors for TNF $\alpha$  and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection. *Immunol.*, v.84, p.549-54, 1995.

CHO, S.N. et al. Use of an artificial antigen containing the 3,6-di-O-methyl-D-glyco-pyranosyl epitope for the serodiagnosis of leprosy. *J. infect. dis.*, v.150, p.311-22, 1984.

CHOUDHURI, K. The immunology of leprosy: Unraveling an Enigma. *Int. J Leprosy*, v.63, p.430-7, 1995.

COSSERMELLI-MESSINA, W., COSSERMELLI, W. Possible mechanisms of chronic leprosy-related arthritis. *Rev. paul. Hoed.*, v.115, p.1406-9, 1997.

DING, A. et al. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-b1, -b2 and -b3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN $\gamma$ . *J. immunol.*, v.145, p.940-4, 1990.

FOSS, N.T. Aspectos imunológicos da hanseníase. *Medicina, Ribeirão Preto*, v.30, p.335-9, 1997.

FOX, FE. et al. Transforming growth factor-b inhibits human T-cell proliferation through multiple targets. *Lymphok. Cytok. Res.*, v.11, p.299-305, 1992.

FUJIWARA, T. et al. Chemical synthesis and serology of disaccharide and trisaccharides of phenolic glycolipid antigens from leprosy bacillus and preparation of a disaccharide protein conjugate for serodiagnosis of leprosy. *Infect. immun.*, v.43, p.245-52, 1984.

GAZZINELLI, R. et al. The microbial activity of interferon gamma treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an I, arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibited by interleukin-10 and transforming growth factor-B. *Eur j. immunol.*, v.22, p.2101-6, 1992.

GELLER, P., GELLER, M. Citocinas e imunorregulação. *Ann. Acad. Nac. Med.*, v.157, p.97-102, 1997.

GOULART, I.M.B. et al. Detection of transforming growth factor-b1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Amer. j. pathol.*, v.148, p.911-7, 1996.

GREEN, S.J. et al. *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN gamma stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor alpha. *J immunol.*, v.145, p.4290-7, 1990.

- GUEDES-BARBOSA, L. et al. Autoantibodies in leprosy sera. *Clin. rheumatol.*, v.15, p.26-8, 1996.
- HIRANO, T. et al. Biological and clinical aspects of interleukin 6. *Immunol. today*, v.11, p.443-9, 1990.
- ISOBE, K., NAKASHIMA, I. Abundant production of nitric oxide from murine macrophages by direct stimulation of tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.192, p.499-504, 1993.
- KAPLAN, G. Recent advances in cytokine therapy in leprosy. *J. infect. dis.*, v.167, S18-S22, 1993.
- KAPLAN, G. et al. *Mycobacterium leprae* antigen-induced cell suppression of the proliferation in vitro. *J. immunol.*, v.138, p.3028-34, 1987.
- KAUFMANN, S.H.E. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol today*, v.16, p.338-42, 1995.
- KRAHENBUHL, J.L. Role of mycobacterial constituents in regulation of macrophage effector function, In: \_\_\_\_\_ . *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. Washington (DC): A.S.M. Press. 1995. p.97-114.
- LEE, H.M., RICH, S. Differential activation of CD8+ T cells by transforming growth factor- $\beta$ 1. *J. immunol.*, v.151, p.66877, 1993.
- LEPOIVRE, M. et al. Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of the nitrite-generating pathway in adenocarcinoma cells. *J. biol. chem.*, v.265, p.14143-9, 1990.
- McCLEAN, K. et al. Phenotype and cytokine expression of intralesional cells in borderline leprosy. *Mt. J. Leprosy*, v.62, p.380-8, 1994.
- MEHRA, V. et al. A major T. cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10kD heat-shock cognate protein. *J. exp. med.*, v.147, p.275-284, 1992.
- MODLIN, R.L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J. invest. dermatol.*, v.102, p.828-32, 1994.
- NAAFS, B. Leprosy reactions. New knowledge. *Trop. geogr. med.*, v.46, p.80-4, 1994.
- NEILL, M.A., KLEBANOFF, S.J. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J. exp. med.*, v.167, p.30-42, 1988.
- PANUNTO-CASTELO, A.; ROQUE-BARREIRA, M. C. 70th anniversary of the Rubino reaction (Editorial). *Int. j Leprosy*, v.64, p.316-9, 1996
- PANUNTO-CASTELO, A., ROQUE-BARREIRA, M. C. Identification of IgM as the leprosy patient serum factor responsible for rapid sedimentation of formalized sheep erythrocytes. *Int. J. Leprosy*, v.63, p.231-40, 1995.
- PINHO, J.R.R., JÚNIOR, H.F.A., SCHENBERG, A.C.G. Os diferentes testes cutâneos existentes para acompanhamento de pacientes com hanseníase. *Hansen. Int.*, v.23, p.49-52, 1998.
- POWRIE F., COFFMAN, R.L. Cytokine regulation of T-cell function potential for therapeutic intervention. *Immunol. today*, v.14, p.270-4, 1993.
- RIDLEY, D.S., JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity - a five group system. *Int. J. Leprosy.*, v.34, p.275-73, 1966.
- ROGGE, L., SINIGAGLIA, F. Regulation of IL-12 receptor expression in developing 1<sup>o</sup> Helper C subsets. *Immunologist*, v.6, p.14245, 1998.
- SALGAME, P. et al. Lymphokine profile of functionally distinct *M. leprae*-reactive CD4+ T-helper and CD8+ T-suppressor clones. *Int. J. Leprosy*, v.59, p.713-4, 1991.
- SIELING, PA., ABRAMS, J.S., YAMAMURA, M. Immunossuppressive roles for IL10 and 11,4 in human infection. *In vitro* modulation of T cell responses in leprosy. *J. immunol.*, v.150, p.5501-10, 1993.
- VESPA, G.N.R., SINA, J.S. Óxido Nítrico (NO): produção e significado fisiológico durante as infecções. *Rev. pat. trop.*, v.23, p.1-23, 1994
- WHEELER, P.R., GREGORY, D. Superoxide dismutase, peroxidatic activity and catalase in *Mycobacterium leprae* purified from armadillo liver. *J. gen. microbiol.*, v.121, p.457, 1980.
- YAMASHITA, J. T. *Sorologia e imunocomplexos circulantes na hanseníase*. Sao Paulo, 1992. Dissertação. UNIFESP. Es cola Paulista de Medicina.
- YOUNG, J.D., LIU, C. Multiple mechanisms of lymphocyte mediated killing. *Immunol. today*, v.9, p.140-44, 1988.