

JAISON ANTÔNIO BARRETO

Hanseníase dimorfa reacional: estudo comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

São Paulo
2005

JAISON ANTÔNIO BARRETO

Hanseníase dimorfa reacional: estudo comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado de Saúde do Estado de São Paulo, para obtenção do título de Mestre.

**Área de Concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública**

Orientador: Prof. Dr. Raul Negrão Fleury

São Paulo
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Barreto, Jaison Antônio

Manifestações *de* padrão tuberculóide reacional na hanseníase dimorfa: estudo histoquímico e imunoistoquímico comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia / Jaison Antônio Barreto. – São Paulo, 2005.

Dissertação (mestrado)—Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientador: Raul Negrão Fleury

1. Hanseníase Dimorfa 2. Antibióticos Combinados 3. Granuloma 4. Contagem de Células 5. Citocinas 6. Sintase de Óxido Nítrico

SES/CCD/CD-059/05

Dedicatória

À minha mãe, Rosa, pelo amor incondicional, exemplo de garra, coragem, honestidade e caráter, que fizeram de mim o que sou;

Às minhas tias Olga, Dilma e ao meu tio Hans, pois sem eles provavelmente eu não chegaria até aqui;

A Cristiane, companheira inseparável, pelo amor e cumplicidade dedicados.

Agradecimentos

Especiais

Ao Dr. Diltor Vladimir Araújo Opromolla, in memoriam, exemplo de dedicação, amor e respeito pelos pacientes; amigo incondicional, mestre paciente, pesquisador incansável, cuja luta contra a Hanseníase tornou este mundo melhor.

Ao Dr. Raul Negrão Fleury, mestre sábio e paciente, muitas vezes paternal, por iniciar-me na Dermatopatologia e por dividir comigo este trabalho.

A Dra. Andréa de Faria Fernandes Belone, pelas muitas horas compartilhadas em discussões científicas, indispensáveis na realização desta dissertação.

Agradecimentos

A Deus, que me deu a vida e tudo o que tenho.

À Equipe Técnica de Imunologia, em especial à Dra. Esther e Dra. Fátima, pelo auxílio na discussão imunológica.

À Equipe Técnica de Patologia, pelo auxílio na confecção das lâminas e na digitação de várias partes deste trabalho.

Ao Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond, que permitiu a realização deste projeto no Instituto Lauro de Souza Lima.

À Paula Araújo Opromolla, que sempre me atendeu com boa vontade e prontidão.

Às funcionárias da Biblioteca do Instituto Lauro de Souza Lima, Cidinha, Rosana, Lucimara, Goretti, Leninha, Alice e Zélia, pela atenção e auxílio.

À Maria Helena Correa, pela prontidão, interesse e ajuda na revisão bibliográfica.

Aos pacientes, que forneceram material biológico para a realização deste estudo.

Ao Dr. Luiz Carlos de Melo, colega de turma e amigo, pelo apoio na fase das viagens Bauru - São Paulo.

Aos Docentes da CIP — CPG, pela inestimável contribuição na edificação do saber e da pesquisa.

Às queridas "meninas" da Secretaria da área de PLSP, Tirces, Líria e Dra. Claydes, pela dedicação e prontidão, principalmente por possibilitar a resolução dos problemas à distância.

A Emiliana Simões Toledo Corrêa, Secretária da CPG-CIP, pelo importantíssimo apoio nas fases iniciais.

"Observei o conjunto da obra de Deus e percebi que o homem não consegue descobrir tudo o que acontece debaixo do sol. Por mais que o homem afadiguese em pesquisar, não chega a compreendê-la. E mesmo que o sábio diga que a conhece, nem por isso é capaz de entendê-la".

Eclesiastes 8, 17

RESUMO

A hanseníase dimorfa é a forma clínica mais freqüentemente associada à ocorrência de reações de hipersensibilidade mediada por células (reações tipo 1), que podem ocorrer antes, durante ou depois do tratamento específico. Há várias teorias a respeito da patogênese dessas reações, as quais estão diretamente ligadas ao dano neural e às sequelas. Visando-se compreender melhor a fisiopatologia das reações tipo 1, foram estudadas 10 biópsias cutâneas de indivíduos com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional não tratados e 10 de indivíduos dimorfos em reação reversa (após o início do tratamento específico), comparando-se os parâmetros morfológicos e imunoistoquímicos. Observou-se, no grupo em tratamento, maior positividade das células para a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e menor quantidade de linfócitos T CD8+ ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas na baciloscopia e positividade para antígenos micobacterianos nos dois grupos, e nem na quantidade de células IL-10+, apesar de ter sido observada correlação negativa entre esta citocina e a proporção CD4/CD8 nos pacientes em tratamento ($p < 0,05$). Notou-se, também, tendência à redução do infiltrado específico (linfócitos T e B) e aumento do número de células citotóxicas inespecíficas (NK) no grupo em tratamento. Estes resultados são concordantes com trabalhos recentes, que sugerem que a reação tipo 1 representaria um desequilíbrio imunológico entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Na presença de muitos bacilos viáveis e no contexto de um paciente sem imunidade celular plena, haveria uma tendência à piora no sentido do pólo virchoviano (*downgrading*), porém o tratamento específico, reduzindo a carga bacilar, favoreceria uma melhora da imunidade efetiva, caracterizada por um quadro histológico mais tuberculóide, com posterior desvio progressivo da imunidade adquirida para a inespecífica (resposta Th3 ou reguladora), interrompendo a reação e levando à cura.

ABSTRACT

Borderline leprosy is the most frequent clinical type of the disease associated with the occurrence of type 1 reactions, which can occur before, during or after the multidrugtherapy. There are several theories about the pathogenesis of these reactions, which are closely related to nerve damage. In order to better understand these reactions, we studied 10 skin biopsies of borderline tuberculoid patients with type 1 reaction without treatment and 10 skin biopsies from borderline patients with reversal reactions (under treatment). Morphological and immunohistochemical parameters were compared. In biopsies of patients with reversal reactions, stronger immunostaining for iNOS inside the cells' infiltrate and decreased amount of CD8+ T lymphocytes were noticed ($p < 0,05$). There weren't significant differences in the bacilloscopy and immunostaining for mycobacterial antigens between these two groups, neither in the amount of IL-10+ cells. Nevertheless, a negative relationship between this cytokine and the ratio CD4/CD8 T lymphocytes was observed in the group with reversal reactions ($p < 0,05$). It was also noticed a trend to reduction in the specific infiltrate (B and T lymphocytes) and an increase in the number of non specific cytotoxic cells (NK cells) in this group. These results are similar to the recent studies that suggest the type 1 reaction could be an immunological imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. The presence of several viable bacilli in a patient without full cellular immunity could progressively and temporarily change the clinical and immunological status towards the lepromatous pole (downgrading). Once started the multidrugtherapy, bacillary load falls, restoring the cellular immunity, which is characterized by a more tuberculoid infiltrate that slowly becomes more non specific (a shift to innate immunity) under the action of regulatory T cell response (Th3 type), stopping the reaction and evolving to cure.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC — complexo avidina-biotina

ADCC — citotoxicidade dependente de anticorpo

AMP — adenosina monofosfato

BAAR — bacilo álcool-ácido resistente

BCG — bacilo de Calmett-Guérin

CAA — célula apresentadora de antígeno

CD — marcador celular (cluster of differentiation)

CMI — imunidade mediada por células

DAB — diaminobenzidina

DD — dimorfo-dimorfo

D-RR — dimorfo em reação reversa

DT — dimorfo-tuberculóide

DTR — dimorfo-tuberculóide reacional

DT-RR — dimorfo-tuberculóide em reação reversa

DV — dimorfo-virchoviano

DV-RR — dimorfo-virchoviano em reação reversa

GM-CFS — fator estimulante de crescimento de colônias de granulócitos
e monócitos

HE — hematoxilina — eosina

HLA — antígeno leucocitário humano

hsp — proteína do choque térmico

IFN — interferon

IL — interleucina

iNOS — óxido nítrico sintase-induzível

LAM — lipoarabinomanana

LPS — lipopolissacarídeo

MHC — complexo maior de histocompatibilidade

mRNA — ácido ribonucléico mensageiro

NK — célula exterminadora natural

NO — óxido nítrico

NT - nitrotirosina
OMS — Organização Mundial da Saúde
ONOO⁻ — peroxinitrito
PBS — solução de tampão fosfato
PGL — glicolípido fenólico
PQT — poliquimioterapia
RNI — radicais intermediários do nitrogênio
ROI — radicais intermediários do oxigênio
TCR — receptor de células T
TGF — fator transformador de crescimento
Th1 — resposta imune celular ou tipo I
Th2 — resposta imune humoral ou tipo II
Th3 — resposta imune reguladora ou tipo III
TNF — fator de necrose tumoral
TR — tuberculóide reacional
TT — tuberculóide polar
VV — virchoviano

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

Quadro 1— Identificação, local da biópsia, idade e sexo dos pacientes com hanseníase dimorfa tuberculóide reacional antes do início do tratamento específico (DTR).....	49
Quadro 2— Identificação, local da biópsia, idade, sexo, tempo de tratamento e diagnóstico inicial dos pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR)	49
Quadro 3 - Avaliação semiquantitativa dos achados histopatológicos das biópsias de indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de hanseníase dimorfa tuberculóide reacional antes do início do tratamento específico (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+)	50
Quadro 4 — Avaliação semiquantitativa dos achados histopatológicos das biópsias de indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de hanseníase dimorfa em reação reversa (DRR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+).....	51
Tabela 1— Análise semiquantitativa baciloscópica e de antígenos micobacterianos em biópsias cutâneas de pacientes DTR. Valores de 0 a 6+, segundo Ridley (1987).	52
Tabela 2- Análise semiquantitativa baciloscópica e de antígenos micobacterianos em biópsias cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores de 0 a 6+, segundo Ridley (1987).	52
Tabela 3— Avaliação quantitativa da população de linfócitos T por mm ² nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas dos pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação.....	53
Tabela 4 - Avaliação semiquantitativa da população de linfócitos B nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas,	

em biópsias cutâneas dos pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação. Valores expressos em + (Escala de 0 a 4+)	54
Tabela 5- Avaliação quantitativa da população de células NK (CD 57+) por mm ² nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação.....	55
Tabela 6 - Avaliação quantitativa da população de células IL-10+ por mm ² nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR.....	56
Tabela 7 - Avaliação semiquantitativa da população de células iNOS+ por mm ² nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR.....	57
Figura 1- Biópsia B04-2826 - Quadro histológico característico: dimorfo-tuberculóide em reação reversa, mostrando granulomas de padrão tuberculóide extensos e confluentes (HE — 50x).....	58
Figura 2 — Detalhe da figura 1: Granulomas de padrão tuberculóide com células epitelióides, linfócitos e célula gigante tipo Langhans (HE — 400x).	58
Figura 3 — Detalhe da figura 1: Granulomas de padrão tuberculóide com células epitelióides predominando e acúmulo focal de linfócitos (HE — 400x).....	59
Figura 4 — Biópsia B04-2826 - Baciloscopia da biópsia típica de quadro dimorfo em reação reversa: grumos de bacilos granulosos em macrófagos vacuolizados em meio a células epitelióides (3+ na escala de Ridley) (Faraco-Fite — 1000x).....	59
Figura 5 — Reação granulomatosa ao redor de ramos nervoso com delaminação do perineuro. Os linfócitos T CD8 coram-se em marrom e vermelho e os CD4 apenas em vermelho. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 — 200x).....	60

Figura 6 — Reação granulomatosa extensa mostrando linfócitos T CD4 e CD8 entremeados, com acúmulo de linfócitos B (não corados) na região central. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 — 200x).....	60
Figura 7—Infiltrado inflamatório mostrando linfócitos T CD4 e CD8 entremeados agredindo ramo nervoso. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 —200x).....	61
Figura 8 — Reação inflamatória granulomatosa mostrando linfócitos B em acúmulos e dispersos em meio ao granuloma. Imunoistoquímica (CD20 — 400X).....	61
Figura 9 — Acúmulo de linfócitos B em localização perivascular na periferia de granulomas. Imunoistoquímica (CD20 — 400X).....	62
Figura 10 — Acúmulos de linfócitos B ativados e plasmócitos no derma reticular profundo. Imunoistoquímica (CD 79 — 200X).	62
Figura 11 — Linfócitos B ativados e plasmócitos formando acúmulos na periferia de granuloma. Imunoistoquímica (CD79 — 400X).	63
Figura 12 — Células NK dispersas em meio à reação granulomatosa. Imunoistoquímica (CD57 — 400X)	63
Figura 13 — Reação granulomatosa mostrando células marcadas positivamente para a enzima óxido nítrico sintase induzível (3+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (iNOS — 400X).....	64
Figura 14 — Reação granulomatosa perivascular mostrando menor intensidade na marcação para iNOS (1+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (iNOS — 400X).....	64
Figura 15 — Macrófagos contendo grande quantidade de lipoarabinomanana no derma superficial (5+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (LAM — 200X).....	65
Figura 16 — Detalhe da figura 15: Macrófagos contendo grande quantidade de lipoarabinomanana superficial (5+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (LAM — 400X).....	65
Figura 17 — Ramo nervoso do derma profundo mostrando forte marcação para anticorpo anti-Mycobacterium bovis (6+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (BCG — 200X).....	66

Figura 18 — Detalhe da figura acima mostrando intensa marcação dentro do ramo nervoso. Imunoistoquímica (BCG — 400X).	66
Figura 19 – Células mononucleares imunomarcadas para IL-10 em meio ao infiltrado linfo-histiocitário perivascular. Imunoistoquímica (IL-10 — 400X).	67

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
1.1. Aspectos gerais.....	20
1.2. Antígenos micobacterianos.....	22
1.3. Imunidade inata	24
1.4. Imunidade adaptativa na hanseníase	25
1.5. Padrão de citocinas na hanseníase	27
1.6. O papel da IL-10 na hanseníase	28
1.7. A função do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na hanseníase	29
1.8. Tratamento da hanseníase	31
1.9. Reação tipo 1	33
1.10. Tratamento das reações reversas.....	37
2. OBJETIVOS	40
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1. Casuística.....	42
3.2. Anticorpos monoclonais.....	42
3.3. Anticorpos policlonais	43
3.4. Estudos imunoistoquímicos.....	43
3.5. Avaliação dos cortes histológicos submetidos a imunoistoquímica	44
3.6. Análise estatística	45

4. RESULTADOS	47
5. DISCUSSÃO	69
6. CONCLUSÕES	78
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81
8. ANEXOS.....	98

Anexo 1 — Análise quantitativa de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Número total de linfócitos T/mm2 distribuídos na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total, e proporção CD4:CD8 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase hanseníase-dimorfa tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR)

98

Anexo 2 — Análise quantitativa de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Número total de linfócitos T/mm2 distribuídos na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total, e proporção CD4:CD8 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase hanseníase-dimorfa em reação reversa (D-RR).....

99

Anexo 3 — Análise semiquantitativa de linfócitos B (CD20+ e CD79+). Distribuição dos linfócitos CD20+ e CD79+ na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-4+)

100

Anexo 4 — Análise semiquantitativa de linfócitos B (CD20+ e CD79+). Distribuição dos linfócitos CD20+ e CD79+ na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores expressos em + (Escala de 0-4+).....

101

Anexo 5 — Análise quantitativa de células NK (CD57+). Número total de células NK/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR).....

102

Anexo 6- Análise quantitativa de células NK (CD57+). Número total de células NK/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR)..... 103

**Anexo 7- Análise quantitativa de células expressando IL-10. Número total de células IL10+/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR).
.....104**

Anexo 8- Análise quantitativa de células expressando IL-10. Número total de células IL10+/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR).....105

Anexo 9- Análise semiquantitativa de células expressando INOS. Imunomarcção positiva de células inflamatórias nas biópsias de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+)..... 106

Anexo - 10 Análise semiquantitativa de células expressando NOS. Imunomarcção positiva de células Inflamatórias nas biópsias de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+).....107

Introdução e Revisão

Bibliográfica

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Aspectos gerais

A hanseníase é uma doença infecto-contagiosa crônica causada pelo *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), cujas manifestações dependem das propriedades do agente etiológico e da reatividade do hospedeiro. O *M. leprae* é um bacilo atóxico, de baixa antigenicidade, muito pobre quanto ao seu metabolismo e, por isso, com um tempo de replicação muito lento (13 a 14 dias)^{1,2}. Essas características devem ser responsáveis pelo período de incubação prolongado e pela baixa sobrevivência no organismo, pois mesmo naqueles indivíduos com defesa imunecelular mínima contra o *M. leprae*, por ocasião do diagnóstico e na ausência de tratamento, já não são viáveis cerca de 90% dos bacilos¹.

Outra de suas peculiaridades é o tropismo pelo sistema nervoso periférico, parasitando preferencialmente ramos sensitivos cutâneos e segmentos mais distais e superficiais dos troncos nervosos, cuja reação do organismo resulta nas seqüelas freqüentemente observadas nestes pacientes³. O comprometimento freqüente da pele e segmentos mais superficiais dos troncos nervosos demonstra, também, a preferência do bacilo de Hansen por temperaturas abaixo da temperatura basal². Finalmente, é um bacilo obrigatoriamente intracelular e, portanto, só é eliminado do organismo por meio da imunidade mediada por células⁴.

Tudo indica que a resistência frente ao *M. leprae* é constitucional. Cerca de 95% da população é resistente, ou seja, entre aqueles que são expostos ao bacilo, somente uma minoria desenvolverá a doença⁵. Na maioria das pessoas que não desenvolvem a hanseníase, ou naquelas com manifestações localizadas e com tendência à cura espontânea, o teste de Mitsuda é positivo⁶. Este teste consiste na injeção intradérmica de 0,1 ml de uma suspensão de bacilos mortos, obtidos através de biópsia de nódulos de pacientes virchovianos, com leitura após 28 dias, sendo considerado um

bom marcador da resistência imune celular, ou seja, é positivo (induração dérmica acima de 5 mm de diâmetro) nas formas de resistência da doença e negativo (induração menor que 5 mm ou ausente) nos indivíduos desprovidos de resistência ou com resistência apenas parcial ^{4, 6}.

Os indivíduos que desenvolvem a Hanseníase de máxima resistência, denominada Tuberculóide polar (TT), mostram quadro estrutural representado pelo granuloma de células epitelióides bem diferenciadas, contornado por halo de células mononucleares, principalmente linfócitos, mas incluindo macrófagos não diferenciados, monócitos; os bacilos são raríssimos ou ausentes ^{6,7}. Já aqueles que desenvolvem a hanseníase de mínima resistência, os virchovianos (VV), mostram, na histopatologia, extensos granulomas de células macrofágicas volumosas, não epitelióides, abarrotadas de bacilos. Os linfócitos são escassos e esparsos no interior dos granulomas ^{6,7}.

Definem-se, portanto, dois pólos nas manifestações de hanseníase, que são estáveis e mutuamente excludentes, ou seja, não modificam suas características na evolução, não havendo transformação de um em outro ⁸. Entre esses dois pólos, há manifestações intermediárias próprias de indivíduos com resistência parcial, caracterizando o grupo dimorfo (D). Dentro deste grupo, há um subgrupo com características muito próximas ao pólo tuberculóide, quanto à morfologia das lesões e à estrutura granulomatosa, porém com lesões múltiplas, freqüentemente generalizadas e apresentando baciloscopia positiva, denominados dimorfo-tuberculóide (DT) ^{6,7,9}. Outro subgrupo tem características próximas às dos virchovianos, porém as lesões deixam áreas cutâneas não comprometidas. Os granulomas são constituídos por macrófagos não diferenciados tendo, de permeio, muitos linfócitos, sendo a baciloscopia muito rica, e são por isso denominados dimorfo-virchovianos (DV) ^{6,7,9}. Um subgrupo absolutamente intermediário, extremamente instável (e por isso o mais raro), o dimorfodimorfo (DD), tem como característica clínica a presença de lesões foveolares (tipo queijo suíço), com limites internos precisos e limites externos imprecisos ¹⁰, e mostra, na histopatologia, granulomas frouxos, com células

epitelióides pouco diferenciadas, escassos linfócitos e rica baciloscopia. O grupo dimorfo não é estável quanto à localização no espectro. Deixados sem tratamento, esses pacientes geralmente pioram, adquirindo progressivamente características semelhantes às descritas para o pólo virchoviano. Quando este comportamento é identificado, estes pacientes são classificados como virchovianos subpolares (VV sp)^{7,11,12}.

A base da resistência imune na hanseníase consiste na interação entre linfócitos T e macrófagos. As células apresentadoras de antígenos (CAA) expõem aos linfócitos T determinantes antigênicos, que estimulam estes linfócitos a proliferarem e a produzirem citocinas as quais, agindo sobre os macrófagos, estimulam a fagocitose e o processamento dos antígenos micobacterianos. Estes macrófagos transformam-se em células epitelióides, formando granulomas tuberculóides⁴. A deficiência total ou parcial desse mecanismo imune resulta nas alterações histopatológicas, baciloscópicas, clínicas e evolutivas próprias dos virchovianos e dos dimorfos¹³.

1.2. Antígenos micobacterianos

A evolução da bacteriologia e da imunologia, principalmente a partir da década de 70, ampliou muito os conhecimentos a respeito das características do *M. leprae* e dos mecanismos de resistência contra a infecção. Assim, principalmente por meio de bacilos obtidos pelo desenvolvimento de infecção experimental em tatus foram detectados componentes bacilares de grande importância no entendimento da doença, bem como em trabalhos experimentais, testes diagnósticos e na detecção de antígenos micobacterianos nos tecidos^{14, 15}.

Dentre os antígenos externos do *M. leprae*, o glicolípido fenólico (PGL-1) é um importante antígeno capsular, específico do bacilo de Hansen, correspondendo a 2% da massa total bacteriana. Tem capacidade para neutralizar radicais livres provenientes do metabolismo oxidativo intrafagolisossomal^{16,19}. O PGL-1 também causa uma inibição específica da

liberação de citocinas por monócitos de indivíduos sadios após estimulação por lipopolissacarídeos *in vitro*²⁰, e é capaz de induzir supressão de resposta mitogênica de linfócitos *in vitro* de pacientes com hanseníase^{21,22}.

A lipoarabinomanana (LAM) é um componente da parede celular comum a várias micobactérias, que podem excretá-la em grande quantidade. Está relacionada à patogênese e sobrevivência do bacilo dentro dos macrófagos², pois bloqueia a capacidade dos macrófagos de responder aos efeitos ativadores do interferon gama (IFN- γ), bloqueia a indução e a liberação do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e inibe a apresentação antigênica pelas CAA^{23,24}.

Estudos imunoistoquímicos com anticorpo anti-PGL-1 demonstraram que este marcador apresenta bons resultados para detecção de antígenos nos tecidos de pacientes multibacilares. Apesar de específico, alguns autores referem que este anticorpo não se mostrou eficaz na detecção de antígenos micobacterianos em casos paucibacilares^{25,26}, resultados estes diferentes daqueles encontrados por Narayanan *et al* (1990)²⁷ e Wang *et al* (1992)²⁸.

O anticorpo anti-LAM parece ter mais sensibilidade, apesar de haver descrição de reatividade cruzada com antígenos de nervos^{25,29}. Em pacientes DT com reação reversa, foi detectada positividade para LAM dentro do granuloma e em macrófagos, mesmo quando a coloração de Faraco-Fite foi negativa²⁴. Verhagen *et al* (1999), analisando a expressão dos antígenos PGL-1 e LAM em biópsias de pacientes com hanseníase, notaram que a positividade para estes antígenos diminuiu com o tratamento, sendo que a imunomarcagem para PGL-1 dentro do granuloma tornou-se negativa antes que o LAM²⁶.

Ainda em relação à detecção de antígenos em biópsias, observa-se que em casos de hanseníase paucibacilar, ou seja, tuberculóide e indeterminada, a baciloscopia da biópsia é, na maioria das vezes, negativa³⁰. Nestes casos, pode-se aumentar a detecção de antígenos bacilares por meio de da utilização do anticorpo policlonal anti-BCG^{31,34}, o qual reage cruzadamente com o *M. leprae*³⁵. Há, porém, a desvantagem de poder

ocorrer marcação de várias outras espécies bactérias e muitos gêneros de fungos^{33,36}.

1.3. Imunidade inata

É necessária a compreensão detalhada dos mecanismos das diferentes respostas imunológicas dos indivíduos à infecção pelo *M. leprae*, para se entender as manifestações clínicas e estruturais na hanseníase. Em primeiro lugar, sabe-se que mais de 95% das pessoas expostas ao bacilo não são suscetíveis à doença, e a maioria destas pessoas livres de doença são Mitsuda positivos^{5,6}. Porém uma minoria, cujo teste de Mitsuda mantém-se negativo após a exposição ao *M. leprae*, também não desenvolve a doença. Isso se deve, provavelmente, à predisposição genética e ao impedimento da infecção pela imunidade inata, que é formada pelas barreiras naturais, representadas pela integridade dos epitélios, secreções e imunoglobulina A (IgA) de superfície, dispersão dos microorganismos no sistema linfático, sistema mononuclear fagocítico³⁷ e por células como os linfócitos NK (células exterminadoras), linfócitos T yó e macrófagos ativados, as quais possuem capacidade microbicida independentemente da ativação da imunidade adaptativa,^{36,39}.

Assim, uma vez o organismo exposto ao bacilo, uma primeira etapa no desenvolvimento da infecção é a passagem pelas barreiras naturais. Se o bacilo ultrapassa essas defesas, encontra os linfócitos T yó, as células exterminadoras naturais (NK) e os macrófagos teciduais. Estas células são as principais responsáveis pela defesa inespecífica na pele e nas mucosas. Os linfócitos T yó circulantes são geralmente CD4- e CD8- (duplo negativos), mas a maioria geralmente apresenta receptores CD8+ nos tecidos³⁹ e, portanto, têm ação citotóxica. Podem reconhecer superantígenos e antígenos de micobactérias⁴⁰, bem como responder a antígenos protéicos presentes em muitos patógenos, denominados proteínas do choque térmico (hsp)^{41,42}, e mesmo reconhecer antígenos apresentados por receptores CD1, como o LAM. Além disso, podem produzir citocinas próprias da

resposta imune celular tipo 1 (Th1) e ativar macrófagos teciduais sem a necessidade prévia de imunidade adaptativa³⁸.

Da mesma forma, as células NK, além de produzirem granzima, perforina, e granulicina, esta última com capacidade destrutiva direta para micobactérias^{38,43}, também podem secretar IFN- γ sob ação da interleucina 12 (IL-12) e interleucina 18 (IL-18) secretadas por macrófagos infectados, estimulando a destruição intrafagolisossomal^{44,45}. Estas células são linfócitos morfológicamente grandes e granulares, não expressam TCR ou imunoglobulina de superfície, podendo participar tanto da imunidade inata quanto da adaptativa, via citotoxicidade dependente de anticorpo (ADCC), ou via produção de citocinas como o IFN- γ , quando estimuladas por interleucina 2 (IL-2)³⁹. São detectadas principalmente pela expressão de CD16, CD56 e CD57³⁹. Existem evidências de que a função citotóxica pode não ser a mais importante função dessa população celular. Esses linfócitos são capazes de produzir IFN- γ , TNF- α , fator estimulante do crescimento de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e interleucina 3 (IL-3)^{46,47}. Podem ter um papel precoce importante nas infecções intracelulares, pois sob estímulos inespecíficos podem induzir a produção de citocinas, sendo a produção de IFN- γ mais rápida e intensa do que pelos linfócitos T^{45, 46}, com os quais atuam sinergicamente na modulação da resposta imune celular⁴⁸.

Romagnani (1992) sugere que a resposta Th1 induzida pelas bactérias intracelulares seja, em parte, devida as células NK, porque são estimuladas diretamente pelas bactérias a produzirem IFN- γ ⁴⁹.

1.4. Imunidade adaptativa na hanseníase

Na hanseníase, ultrapassada a imunidade inata e instalada a infecção em nível cutâneo-neural, desenvolve-se a resposta adaptativa. Esta é espectral, variando de acordo com a imunidade celular do hospedeiro, uma vez que a imunidade humoral é ineficiente para a destruição de patógenos intracelulares⁴⁴.

Nos indivíduos praticamente sem imunidade celular, ou seja, os virchovianos, os bacilos serão fagocitados e multiplicar-se-ão livremente, atraindo novos macrófagos para o local, desenvolvendo um granuloma macrofágico não diferenciado. Nesta forma, a análise histopatológica mostra extenso infiltrado macrofágico, onde os macrófagos são volumosos, abarrotados de bacilos, com citoplasma homogêneo, levemente vacuolar ou multivacuolar (célula de Virchow)^{6,7}. Os linfócitos são escassos, focais, com predomínio de células CD8+/CD28- (supressoras) e estão distribuídos entre os macrófagos⁴².

Desde 1983, vários autores⁵⁰⁻⁵² vêm postulando que, nos pacientes com imunidade celular plena, os tuberculóides, o granuloma é formado por agregados de macrófagos com diferenciação epitelióide bem evidente, células gigantes multinucleadas tipo Langhans, linfócitos CD4+ justapostos aos macrófagos no centro da lesão, e com muitas células CD8+ restritas ao manguito que contorna o granuloma. Modlin *et al* (1988) referiram que as células CD4+, presentes no centro do granuloma, são linfócitos T de memória, sendo que as células *T-naive* estavam localizadas no manguito linfocitário em volta do granuloma, perto das células CD8+, que são predominantemente CD28+ (citotóxicas)⁵³. Analisando a taxa CD4:CD8 em biópsias de lesões da hanseníase, identificaram, também, que a população CD4 era maior, com uma taxa de 1,9:1 nas lesões TT, enquanto que em lesões VV a população CD8+ predominava, com uma taxa CD4:CD8 de 0,6:1. A proporção CD4:CD8 presente nas lesões eram independentes daquelas encontradas no sangue dos pacientes, sugerindo migração seletiva para dentro das lesões, proliferação ou mesmo retenção nas lesões. Apesar de a proporção CD4:CD8 ser de 2:1 no sangue e nas lesões de pacientes TT, a população de linfócitos T no tecido não representa um filtrado aleatório do sangue. A taxa T-memória: *T-naive* é de 1:1 no sangue, mas é de 14:1 nas lesões, ou seja, as células CD4+ nas lesões TT expressam fenótipo T-memória (CD45RO+). Já nas lesões LL, a metade das células CD4+ pertence à subclasse de células *T-naive*⁴².

Recentemente, Fakhouri *et al* (2003) estudaram quantitativamente a população celular em biópsias de pacientes com diferentes formas de hanseníase tuberculóide, tendo encontrado linfócitos B e células NK em todos os casos. A distribuição dos linfócitos CD4+ e CD8+ foi semelhante àquela descrita por Modlin, porém a taxa CD4:CD8 (valores expressos em mediana) nos adultos com hanseníase tuberculóide foi de 1,28:1.

Na hanseníase, a proteção contra o *M. leprae* é criticamente dependente da função das células NK nos estágios mais iniciais da infecção e da resposta imune celular na fase tardia⁵⁴.

1.5. Padrão de citocinas na hanseníase

O entendimento da regulação da resposta imune às infecções resultou de análise do padrão de citocinas produzido por clones de linfócitos T CD4+ murinos. Nesses modelos, na infecção intracelular, a resposta imune resistente *versus* suscetível parece ser regulada por duas subpopulações de linfócitos T, gerando as respostas Th1 e tipo 2 (Th2)⁵⁵. Da mesma forma, na hanseníase, a resposta Th1, ou celular, confere resistência à infecção e a resposta Th2, ou humoral, torna o indivíduo suscetível à progressão da doença^{56,58}. As subpopulações de linfócitos T, que produzem IL-2 e IFN- γ , chamadas Th1, aumentam a imunidade mediada por células. O IFN- γ ativa macrófagos e a IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais controlada ou cura. Linfócitos T, que produzem as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10 geram a resposta tipo Th2, que é a resposta humoral⁵⁹. Tanto a IL-4 quanto a IL-10 estimulam células B, que inibem a ativação de macrófago, resultando em infecção progressiva^{38,58}.

Estudos imunoistoquímicos, por hibridização *in situ*, e amplificações de RNA mensageiro (mRNA) nas lesões de hanseníase têm demonstrado que, na forma TT, há predomínio de citocinas Th1 (IL-2, IFN- γ e TNF- α), caracterizando resposta imune celular eficiente e resistência à proliferação do *M. leprae*, com tendência à cura espontânea. Na forma W, prevalecem

as citocinas de padrão Th2 (IL-4, IL-5 e IL-10), resultando em uma resposta imune humoral, que se mostra ineficaz, com produção aumentada de anticorpos e disseminação da infecção ^{41, 56}.

1.6.0 papel da IL-10 na hanseníase

A Interleucina 10, também chamada fator inibidor da síntese de citocinas, foi descrita inicialmente como o fator produzido por linfócitos T CD4+ Th2 capaz de suprimir a produção de citocinas por linfócitos T CD4+ Th1 ⁶⁰. Em seguida, demonstrou-se que a IL-10 era produzida também por linfócitos B, mastócitos, queratinócitos, eosinófilos, células dendríticas, monócitos e macrófagos, estes últimos sendo a principal fonte fisiológica de IL-10^{60,64}. A produção desta citocina por estas células está aumentada na presença de endotoxinas, TNF- α , catecolaminas e de drogas que elevam os níveis de adenosina monofosfato (AMP) cíclico ⁶⁴.

A IL-10 inibe a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4+, CD8+ e por células NK. Essa inibição da função dos linfócitos Th1 parece ser devida à sua ação por meio de células acessórias agindo nos macrófagos, dependente ou independentemente da interação com moléculas de classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC-II)^{62,65}. Além disso, suprime a produção de citocinas pelos macrófagos ativados (TNF- α , IL-1, IL-6, IL-12) e a capacidade microbicida dessas células por inibição da expressão do receptor co-estimulador CD28, indispensável na formação de radicais intermediários de oxigênio (ROI) e de nitrogênio (RNI)^{62,64,66}. A IL-10 bloqueia a proliferação linfocitária, tanto de linfócitos Th1 como Th2, e a produção de IL-2 e de IFN- γ ⁶⁷ em resposta a antígenos e mitógenos, mas não inibe a proliferação induzida pela IL-2. Reduz também a produção de IFN- γ pelos linfócitos Th1 ⁶⁸, e de IL-4 pelos Th2 ^{64, 69}.

A IL-10 pode ser produzida tanto pelos linfócitos T CD4+ quanto por linfócitos B ativados da resposta Th2, estimulando a apresentação de antígenos por linfócitos B. Estas podem ser as principais células apresentadoras de antígeno nos casos onde haja pouco antígeno local ⁷⁰

inibindo a apresentação antigênica por células profissionalmente apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos ⁶⁴. Também pode ser produzida por linfócitos T CD4⁺ da resposta tipo 3 (Th3), ou reguladora, presente em qualquer tipo de resposta adaptativa ⁶⁴. A IL-10 e o IFN γ são citocinas antagônicas não só na função, como também na produção, uma vez que o IFN- γ inibe a produção de IL-10 por monócitos. Apesar de ter as funções de inibir a imunidade celular, estimular a imunidade humoral, ou regular os dois tipos de resposta adaptativa, a IL-10 estimula a citotoxicidade mediada por células e a imunidade inata, pois aumenta a proliferação de mastócitos, a fagocitose e a produção de citocinas pelas células NK induzida por IL-2⁶⁴.

Na hanseníase, foi descrito que a IL-10 é expressa em altos níveis (mRNA) nas lesões do pólo W, quando comparados às lesões do pólo TT ⁵⁸, porém clones de linfócitos T das lesões de pele dos pacientes VV produzem apenas pequena quantidade dessa interleucina ⁴⁴. Anticorpos monoclonais anti-IL-10 aumentaram significativamente a proliferação de clones de linfócitos T específicos para o *M. leprae* e a liberação de TNF- α e IFN- γ . Esses dados indicam que o *M. leprae* induz a produção de IL-10 pelos macrófagos, a qual inibe a proliferação de linfócitos T CD4 Th1 ⁴⁴.

1.7. A função do óxido nítrico sintase induzível (iNOS) na hanseníase

Uma efetiva resposta mediada por células T, e conseqüente eliminação do *M. leprae*, dependem do macrófago e de sua adequada ativação⁷¹. O NO é um gás, produto do metabolismo da L-arginina sob a ação das isoenzimas, denominadas NO-sintases (NOS). As NOS existem como três isoformas, denominadas NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e NOS induzível (iNOS)⁷². A síntese de NO tem sido observada em macrófagos e células gigantes multinucleadas, bem como em outras células, como fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais⁷³, células de Langerhans ⁷⁴, eosinófilos ⁷⁵, neutrófilos ⁷⁶, linfócitos T helper ⁷⁷,

osteoclastos e osteoblastos⁷⁸, podendo ter vários efeitos, dependendo do tipo de célula que a produz, do sítio de liberação e da concentração produzida⁷⁸. O NO é uma toxina oxigênio-independente, sendo uma das mais importantes para destruição de parasitas intracelulares, e pode se combinar com radicais intermediários de oxigênio, originando compostos citotóxicos como o peroxinitrito (ONOO⁻), o qual é mais potente que seus precursores^{23, 73}.

A iNOS, responsável pela síntese do NO, é expressa por células inflamatórias por meio de estímulos de substâncias como os lipopolissacarídeos (LPS), fragmentos antigênicos de micobactérias, fungos e protozoários, e por citocinas inflamatórias e/ou imunorreguladoras como IL-1, TNF- α , TNF- β , IFN- γ . Em contrapartida, as citocinas IL-10, IL-4 e o fator transformador do crescimento β (TGF- β) inibem a expressão de iNOS e conseqüente produção de NO por macrófagos *in vitro*^{80, 81}.

Tem sido evidenciada intensa expressão de INOS em células epitelióides e células gigantes multinucleadas de granulomas causados por *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans* e *Leishmania sp*^{71,73,82, 83}.

O NO apresenta importante papel imunorregulador, sendo produzido e atuando sobre as principais células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos T⁷⁷. A produção de NO por linfócitos T CD4⁺ e sua participação na modulação da resposta imune celular permanecem controversas. Estudo *in vitro* demonstrou produção de NO por células Th1, mas não por células Th2. Além disso, o NO inibiu a secreção de IL-2 e IFN- γ e não causou nenhum efeito na produção de IL-4 por células Th2. De acordo com Taylor-Robinson *et al* (1994), o NO produzido por células Th1 participa de um mecanismo de retroalimentação negativo, inibindo a produção de IL-2 e IFN- γ e prevenindo, assim, a proliferação de células Th1, de células CD8⁺ e de macrófagos⁷⁷; adicionalmente, as células Th2 proliferaram na presença de IL-4, cuja produção não foi afetada pelo NO. De acordo com esses achados, as células Th1 e Th2 podem ser distinguidas por diferentes padrões de citocinas produzidas e diferente susceptibilidade ao iNOS. O NO também

contribui para supressão da resposta imune, graças à inibição da expressão pelos macrófagos da molécula MHC de classe II, prejudicando a apresentação antigênica ⁸⁴.

Na hanseníase, o NO desempenha importante papel na destruição do *M. leprae*. Avaliando a expressão de iNOS e TGF- β nas formas da hanseníase, Khanolkar *et al* (1998) evidenciaram forte marcação de iNOS nos pacientes TT, moderada positividade nas manifestações dimorfas com reação reversa (DT-RR e DL-RR) e ausência de reatividade nos DT e W. A positividade para TGF- β foi maior nos VV, sugerindo supressão da resposta imunológica por excesso de antígeno; nos pacientes em reação reversa, essa imunomarcagem foi ausente, indicando desregulação no balanço iNOS/TGF- β . O TGF- β também foi negativo dentro dos granulomas reacionais, porém em dois casos foi positivo no perineuro, sugerindo produção. pelas células perineurais, como forma de defesa, já que essa citocina inibe a produção de NO. Portanto, a produção de TGF- β poderia ser responsável pela fibrose dos nervos, observada após a reação reversa ⁷¹.

Schön *et al* (2001) detectaram, em pacientes dimorfos não tratados com e sem reação reversa, a produção de NO e ONOO", por meio de anticorpos anti-iNOS e anti-nitrotirosina (NT). Observaram forte imunomarcagem para iNOS e NT nos macrófagos dos granulomas infiltrando nervos dérmicos, indicando que reativos intermediários de nitrogênio (RNI) podem estar envolvidos no dano neural. Os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais próximas à reação granulomatosa também foram imunomarcados. A expressão de iNOS e NT foi semelhante, e presente em todos os pacientes ⁷³.

1.8. Tratamento da hanseníase

Até 1943, não havia nenhum tratamento eficaz contra a hanseníase. Nesta data, Faget introduziu a sulfona, no início sob a forma do Promin, no Carville (EUA)⁸⁵. No final da década de 40, começou-se a utilizar a 4, 4' — diaminodifenilsulfona, também chamada dapsona ou DDS, que provou ser

eficaz contra o *M. leprae* em doses baixas, tornando-se a droga de escolha. A dapsona é droga bacteriostática, e levemente bactericida quando utilizada na dose diária de 100 mg (OMS, 1982). Age por competição com o ácido paraminobenzóico (PABA), bloqueando a síntese do ácido diidrofólico ⁸⁶.

Devido aos vários casos de resistência bacteriana a esta droga, quando utilizada isoladamente ^{87,88}, em 1963, Opromolla introduziu a rifamicina parenteral, isolada ou associada à dapsona ⁸⁹, que logo foi substituída pela rifampicina oral. A rifampicina é bactericida, interferindo na síntese de RNA bacilar, e atinge tanto o meio intracelular quanto o extracelular. É tão eficaz que, com apenas uma única dose de 600mg, reduz-se a quantidade de bacilos viáveis de um paciente virchoviano, estimada na ordem de 10 a 100 bilhões, para cerca de 1 milhão ⁹⁰. Porém, quando utilizada isoladamente, também há possibilidade de resistência bacteriana ⁹¹, e por isso recomenda-se a associação com outras drogas, como a clofazimina, um corante com atividade fracamente bactericida (OMS, 1982) ⁸⁶, mas que apresenta as vantagens de não haver resistência bacteriana conhecida e de ter ação antiinflamatória, tendo algum valor, portanto, no manuseio das reações hansênicas ⁹².

Por tudo o que foi exposto acima, um comitê de especialistas da OMS sugeriu, em 1982, a poliquimioterapia (PQT) ⁸⁶ para o tratamento da hanseníase. Os regimes de tratamento, atualmente recomendados para utilização no Brasil, dividem-se em dois esquemas:

1. Paucibacilares — pacientes com até cinco lesões: uma dose mensal supervisionada de rifampicina 600mg e uma dose diária auto-administrada de dapsona 100mg, por um período de seis meses.
2. Multibacilares — pacientes com mais de cinco lesões: uma dose mensal supervisionada de rifampicina 600mg + uma dose mensal supervisionada de clofazimina 300mg e uma dose auto-administrada de dapsona 100mg + uma dose auto-administrada de clofazimina 50mg, por um período de um ano ⁹³.

Outras drogas, como minociclina, ofloxacina, claritromicina, etionamida e aminoglicosídeos, apesar de também terem ação contra o *M. leprae*, não são recomendadas para utilização como drogas de primeira escolha, ou mesmo para substituição pelo esquema clássico, pois a PQT tem níveis de toxicidade e taxa de recidiva extremamente baixos ⁹².

1.9. Reação tipo 1

Um aspecto interessante é que, mesmo nas manifestações de hanseníase com resistência máxima ou parcial, ou seja, TT e grupo dimorfo, provavelmente devido à baixa antigenicidade do *M. leprae*, as lesões cutâneas não mostram sinais inflamatórios intensos; apresentam tom acobreado, desprovido de brilho e são secas (lesões tórpidas). Do ponto de vista histopatológico, os granulomas são bem delimitados, ramificados, sem extensão ao interstício, constituídos apenas pelos elementos próprios da reação inflamatória crônica (linfócitos, macrófagos, células epitelióides e gigantócitos) ^{6,7}. Em mais de 50% dos indivíduos dimorfos ¹⁰, no entanto, as lesões tórpidas, de maneira mais ou menos abrupta, se tumefazem, tornando-se eritematosas e novas lesões aparecem ⁹⁴. Estas lesões de padrão inflamatório mais agudo, ou seja, com eritema, edema e, mais raramente necrose e ulceração, podem ser a primeira manifestação da doença, ou podem ocorrer durante ou após o tratamento ^{95,96}, sendo mais precoces nos pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide e dimorfadimorfa e mais tardias na dimorfa-virchoviana ⁹⁶. Outros indivíduos, na faixa tuberculóide do espectro, já apresentam, antes do início do tratamento específico, pápulas, placas ou nódulos eritemato-edematosos disseminados ⁹⁶. Na análise histopatológica, os granulomas são mais extensos, mal delimitados e confluentes; há edema intersticial e intracelular, eventual deposição intersticial de fibrina e, por vezes, necrose e ulceração ⁹⁷. Esse tipo de reação, que envolve hipersensibilidade, é denominado por Jopling de reação tipo 1 ⁹⁸.

Na era pré-sulfônica, Souza Lima & Souza Campos descreveram esse tipo de comportamento, em seu tratado "Lepra tuberculóide" (1947). Distinguiram dois tipos de manifestações reacionais na faixa tuberculóide. Alguns indivíduos desenvolviam, de maneira abrupta, episódios com as características referidas, com certo grau de comprometimento do estado geral, sintomas neurológicos em múltiplas localizações, edema de extremidades, com baciloscopia permanentemente positiva. Os indivíduos com esse padrão reacional respondiam fracamente ou não respondiam ao teste de Mitsuda; mostravam tendência a repetir esses episódios e, onde havia modificação das lesões, estas assumiam características semelhantes àquelas observadas nos virchovianos ⁹⁹. Eram, pois, instáveis, e na classificação de Madrid (1953) foram incluídos no grupo dimorfo ¹⁰⁰. Outros indivíduos, também com episódios reacionais, mostravam lesões mais localizadas, sem edema de extremidades, sem sintomas gerais e com sintomas neurológicos discretos ou ausentes; a baciloscopia era transitoriamente positiva, o teste de Mitsuda era sempre positivo, e após um ou mais episódios reacionais evoluíam para a cura, com ou sem lesões residuais. Denominaram esses pacientes de Tuberculóides reacionais. Na classificação de Madrid, identificam-se como Tuberculóides *major*¹⁰¹, mas na classificação de Ridley e Jopling (1962 e 1966) não há referência a essa manifestação, que provavelmente foi incluída no subgrupo dimorfo-tuberculóide ^{11,12}.

Ridley, no entanto, em 1987, em sua excelente obra "Skin biopsy in leprosy, 2 ed.", referiu dois subtipos no pólo tuberculóide. O primeiro, denominado Tuberculóide primário, com resistência máxima, apresentando poucas ou solitárias lesões, que tendiam à cura espontânea. O outro, onde os indivíduos manifestavam inicialmente quadro clínico com características DT, mas na sua evolução, por meio de reações com características de hipersensibilidade celular e com maior potencial destrutivo sobre os tecidos, assumiam características nitidamente tuberculóides, ficando implícita a evolução para a cura espontânea. Para esse autor, nesses pacientes haveria um retardo no reconhecimento dos antígenos micobacterianos pelo

sistema imune de tal modo que, quando esse reconhecimento imune se estabelecesse, desencadear-se-ia quadro reacional com alto grau de hipersensibilidade. Classificou este subtipo, também polar, como Tuberculóide secundário⁷.

Lastoria *et al* (1998) estudaram dois grupos de pacientes (DTR e TR) por meio do teste de Mitsuda seriado (30, 60, 90, 120 dias). Verificaram que os TR apresentavam sempre reação de Mitsuda positiva e, em geral, mantinham o quadro granulomatoso dos 30 aos 120 dias, mostrando grau muito mais eficiente de *clearance* bacilar do que os DTR¹⁰².

Como já foi referido, além das reações tipo 1 que se manifestam antes do início do tratamento específico, há ainda aquelas que se desenvolvem durante ou após o seu término. Estas reações variam quanto ao tempo de instalação, intensidade, grau de envolvimento neurológico, tempo de duração e características histopatológicas⁹⁰. Muitas vezes, indivíduos considerados como virchovianos ou dimorfo-virchovianos podem desenvolver reações tipo 1 onde, do ponto de vista clínico e histopatológico mostram, com intensidade variada, aspectos mais tuberculóides. Este tipo de reação recebe a designação de reação reversa, ou "upgrading"^{6,7}.

A patogênese destas reações é desconhecida. Para alguns autores, no indivíduo dimorfo não tratado, haveria proliferação bacilar progressiva, que induziria depressão da imunidade mediada por células (CMI). Em essência, seria o desvio de uma resposta Th1 para Th2. Uma vez instalado o tratamento, a redução da carga bacilar levaria a uma recuperação da CMI, e instalação de reações granulomatosas mais tuberculóides^{7,71}. Para outros, qualquer que seja o esquema de tratamento, devido às características do *M. leprae*, pode haver persistência do bacilo em locais protegidos do sistema imune^{103,104}, como em músculo eretor do pêlo, ramos nervosos e parede vascular¹⁰⁵. Estes bacilos, em condições ideais, podem voltar a proliferar, e estimular, em um paciente com alguma imunidade celular, uma reação de hipersensibilidade retardada, ou reação tipo 1 de Jopling¹⁰⁶. Portanto, apesar de haver taxas de recidiva muito baixas com a utilização da PQT, permanece ainda o grande problema na diferenciação

entre recidiva e reação reversa ¹⁰⁷. Harboe considera que a quebra do equilíbrio entre a quantidade de antígenos bacilares e a resposta do hospedeiro levaria às mudanças abruptas nas características clínicas ⁴. Para Ridley & Radia (1981), a avaliação da biópsia pós-reação separa uma reação de uma piora, denominada por eles de "downgrading"¹⁰⁸. Assim, considerando que a célula epitelióide é o resultado do processamento efetivo do antígeno, a presença de bacilos típicos na biópsia de um paciente corretamente tratado ¹⁰⁹, no contexto de um granuloma tuberculóide, indicaria recidiva, e a ausência destes, reação reversa ¹⁰⁵.

Estudos imunoistoquímicos em biópsias de lesões de pacientes com reação reversa demonstraram aumento de células CD4+ na lesão ^{83,110}. O número de células com receptores para IL-2, bem como a expressão de HLA-DR em células do infiltrado e em queratinócitos da epiderme também estão aumentados, por ação do INF- γ ⁵³. A expressão de mRNA para IL-16, TNF- α , IL-2, INF- γ e IL-12¹¹¹ está igualmente aumentada, permanecendo fixas as taxas CD4/CD8, entre 1,7 e 1,8:1 ⁸³.

Os trabalhos sobre a expressão de IL-10 (resposta Th2 ou Th3), bem como a expressão de citocinas de padrão Th2 (IL-4 e IL-5), nas lesões de reação tipo 1, mostram resultados conflitantes. Yamamura *et al* (1992) referem níveis diminuídos de mRNA para IL-4, IL-5 e IL-10, em biópsias de pacientes dimorfo-dimorfos (DD) em reação reversa, quando comparados com dimorfo-virchovianos (DV) não reacionais ¹¹⁰. Recentemente, porém, foi observado que esses episódios estão associados com elevados níveis de citocinas, incluindo as pró-inflamatórias (IL-12, INF γ e TNF α), e as antiinflamatórias (IL-10 e TGF β) sugerindo que, dentro do granuloma, o controle da rede de citocinas parece ser auto-regulatório, e que um simples modelo de resposta Th1 é insuficiente para explicar a patologia reacional ¹¹². Na reação tipo 1, também foi relatada a presença de iNOS no citoplasma dos macrófagos dos pacientes dimorfos reacionais ¹¹⁰, porém em nível menor do que nos TT ⁷¹. Essa positividade correlacionou-se com a presença de INF- γ e IL-12⁸³.

Nenhuma diferença significativa da atividade NK foi evidenciada na hanseníase entre os pacientes com reação tipo I e os não reacionais, notando-se, nos pacientes reacionais, uma correlação entre a atividade NK e a positividade à Reação de Mitsuda ¹¹³.

1.10. Tratamento das reações reversas

O principal problema encontrado no decorrer do tratamento da hanseníase dimorfa é a ocorrência de reações reversas; caracterizadas predominantemente por extenso comprometimento neurológico, com piora dos sintomas já apresentados antes do tratamento, como aumento da extensão das alterações de sensibilidade e da anestesia / hipoestesia, e / ou paralisia / paresia de extremidades, ou pelo aparecimento súbito de dor, aumento do calibre e da sensibilidade de nervos periféricos ¹¹⁴.

Como uma reação reversa dura entre 3 e 6 meses e o tratamento específico com a poliquimioterapia não altera o seu curso, uma vez iniciada, há indicação da introdução de corticosteróides, na dose de 60-80mg por dia, somente nos casos onde haja neurite ou extensas ulcerações. Se os sintomas não melhoram em 24-48 horas, a dose deve ser aumentada em 20-40mg. Little *et al* (2001) referem que a expressão mRNA para citocinas pró-inflamatórias nas lesões reacionais pode se manter por até seis meses⁸³.

Nos outros casos, utilizam-se antiinflamatórios não hormonais, cloroquina, ou clofazimina na dosagem de 300mg/dia. A retirada deve ser lenta e gradual, nos casos com maior severidade do quadro reacional, ou mais rápida nos casos mais leves. O tratamento com corticoesteróides também ajuda a diferenciar entre reação e recidiva, uma vez que a recidiva não melhora com a utilização desta droga ⁹².

Teoricamente, o desenvolvimento de reação tipo 1 início do tratamento específico na hanseníase dimorfa indicaria um padrão de

comportamento imunocelular próprio do indivíduo, provavelmente frente à carga antigênica elevada. Nos indivíduos que desenvolvem reações tipo 1 durante o tratamento, haveria recuperação da CMI, previamente deprimida frente à proliferação bacteriana progressiva anterior ao tratamento⁷¹.

São, pois, dois contextos diferentes que pretendemos estudar em biópsias cutâneas de pacientes dimorfos com reação tipo 1, por meio de técnicas histoquímicas de rotina - hematoxilina-eosina (HE) e Faraco-Fite - e técnicas de imunohistoquímica. Por meio destas últimas, avaliando a população celular, a atividade macrófaga, a presença de antígenos micobacterianos nos tecidos e a atividade moduladora / supressora da citocina IL-10.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo estudar e comparar as manifestações reacionais entre pacientes com hanseníase dimorfa tuberculóide reacional antes do início do de tratamento específico (DTR) e pacientes com hanseníase dimorfa em tratamento e com reação reversa (D-RR), analisando, por meio de técnicas histoquímicas (HE e Faraco-Fite) e imunoistoquímicas:

- A morfologia dos granulomas e sua baciloscopia;
- A população celular e sua distribuição nos granulomas;
- A atividade dos macrófagos, por meio da detecção do óxido nítrico sintase induzível (iNOS);
- A presença de resposta moduladora / supressora, pela quantificação da interleucina 10 (IL-10);
- A presença dos antígenos micobacterianos nos tecidos, por meio da quantificação da lipoarabinomanana (LAM) e antígenos do *Mycobacterium bovis* (BCG).

Materiais e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Casuística

Foram selecionadas dos arquivos da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Lauro de Souza Lima, pertencente à Coordenadoria dos Institutos de Pesquisa da Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, lâminas de histologia e blocos de parafina de biópsias cutâneas de 10 indivíduos diagnosticados clinicamente como Dimorfo Tuberculóide Reacional antes do início do tratamento específico (DTR), e 10 indivíduos diagnosticados clinicamente como dimorfos com reação tipo 1 na vigência de poliquimioterapia para multibacilares (D-RR). Os critérios de escolha utilizados foram o diagnóstico clínico, confirmado pelo exame histopatológico, e a qualidade e volume do tecido incluído em parafina, para possibilitar a realização de grande número de cortes histológicos e com boa qualidade para a confecção de lâminas para imunoistoquímica.

Os critérios diagnósticos, tanto quanto à classificação histopatológica quanto à condição reacional, foram os expostos por Ridley (1987)⁷.

3.2. Anticorpos monoclonais

Os anticorpos monoclonais, com suas diluições, utilizados neste estudo foram: anti-CD8 (Dako/M7103 — 1:25), anti-CD20 (Dako/M0755-1:100), anti-CD79 (Dako/M7050— 1:50), anti-CD68 (Dako/M0814 - 1:1000), anti-CD57 (Lab.Vision/MS.136P — 1:100), anti-IL-10 (R&D Systems/MAB285 - 1200) e anti-LAM (Lab. AMC/F30.5 — 1:500).

3.3. Anticorpos policlonais

Os anticorpos policlonais e suas diluições foram: anti-CD3 (Dako/A0452 — 1:75), anti-iNOS (Santa Cruz Biotechnology Inc./sc-651 — 1:500) e anti-BCG (Dako/B0124 — 1:2000).

3.4. Estudos imunoistoquímicos

As células mononucleares (linfócitos T, linfócitos B, plasmócitos, células NK e macrófagos), antígenos micobacterianos, a enzima óxido nítrico sintase e a interleucina 10, no infiltrado inflamatório, foram identificadas por método imunoistoquímico empregando-se a marcação pela imunoperoxidase por meio do Sistema Dako EnVision⁺ (K4001 e K4003) Os cortes seriados foram colhidos em lâminas de vidro silanizadas (Dako, S3003, Glostrup-Denmark) e submetidos a processos de desparafinização e hidratação. Em seguida, as lâminas foram tratadas com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol, por 30 min, para bloqueio da peroxidase endógena e posteriormente, aquecidas a 95°C, por 10 min, em tampão citrato a 10mM pH 6,0 para recuperação antigênica dos marcadores CD3, CDB, CD20, CD79 e iNOS. Após resfriamento, as lâminas foram incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com os anticorpos primários. A seguir, foram incubadas por 30 min com o Sistema Dako EnVision⁺, posteriormente, com DAB (3'3' tetra-hidrocloro de diaminobenzidina) (Sigma) e contra-coradas em hematoxilina de Harris.

A imunomarcação para IL-10 seguiu o método ABC com o Kit Vectastain Elite (Vector Lab./6102), porém fez-se a recuperação antigênica com tripsina a 0,25% em PBS e o bloqueio de proteínas inespecíficas do tecido com incubação do soro AB humano.

Os linfócitos T CD4⁺ foram identificados empregando-se o Sistema de Dupla-Coloração Dako EnVision (K1395), com os marcadores CD3 e

CD8. O anticorpo primário antilinfócito T supressor/citotóxico (CD8) foi incubado com polímero marcado com peroxidase e revelado com DAB. Em seguida, após o emprego da solução bloqueadora, o anticorpo primário antilinfócito T (CD3) foi incubado com polímero marcado com fosfatase e incubado com *Fast Red*. Os linfócitos T CD8+ ficaram corados de marrom, enquanto os linfócitos T CD3+ coraram-se de vermelho caracterizando, desse modo, linfócitos T CD4+ todos aqueles que apresentaram coloração vermelha.

Como controle positivo para marcação da população celular, foi utilizado material histológico proveniente de amigdalectomia e, como controle positivo para os anticorpos anti-LAM, anti-BCG e anti-IL-10, foram utilizados blocos de biópsias de pele incluídos em parafina oriundos de pacientes com diagnóstico de hanseníase virchoviana. Ambas foram incubadas com os anticorpos primários. Os controles negativos foram obtidos omitindo-se os anticorpos primários, os quais foram substituídos por PBS.

3.5. Avaliação dos cortes histológicos submetidos a Imunoistoquímica

O número de linfócitos T CD4+, TCD8+, células NK e células com expressão de IL-10 positivas foi obtido contando-se 15 campos de 0,0625mm² (aproximadamente 1mm²), sendo 5 campos na derme papilar, 5 na derme reticular média e 5 na profunda, sorteados no aumento de 400x. Esta contagem foi realizada mediante consenso entre três observadores.

A avaliação da população dos linfócitos B CD20+ e CD79+ foi realizada por 3 observadores, em escala semiquantitativa de 0 a 4+, sendo: 0 = ausente; 1+ = mínimo; 2+ = discreto; 3+ = moderado; 4+ = intenso.

A população de células iNOS positivas foi avaliada por 3 observadores independentes, de forma semiquantitativa, de 0 a 3+, sendo:

0 = ausente; 1+ = 1 a 10% de células imunomarcadas; 2+ = 11 a 20% de marcadas; 3+ = mais de 20% das células marcadas.

Os antígenos micobacterianos, assim como os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), foram verificados em todo o corte histológico com os anticorpos anti-BCG, anti-LAM e com a técnica de Faraco-Fite, utilizando-se a escala de 0 a 6+, de acordo com Ridley (1987). A representação morfológica dos antígenos micobacterianos mostrou fragmentos antigênicos bem individualizados, permitindo contagem igual àquela utilizada para quantificar os bacilos em cortes corados pela técnica do Faraco-Fite.

3.6. Análise estatística

Os resultados obtidos de cada grupo estudado foram submetidos à análise estatística por meio do método não paramétrico Kruskal-Wallis. Para comparação entre os grupos das variáveis quantitativas foi aplicado o teste "t" de Student. Para correlação entre variáveis semiquantitativas entre os dois grupos, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Para análise da correlação entre variáveis semiquantitativas e quantitativas num mesmo grupo, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Para as variáveis que foram significativas, foram aplicados o teste de comparação múltipla, teste de Dunn, e o teste de Wilcoxon para duas amostras independentes. Para a comparação entre as áreas da derme superficial, média e profunda usou-se o teste de Friedman, levando em conta a dependência entre as áreas. Para as variáveis apresentaram diferença significativa, foi aplicado o teste de Dunn. Para análise de correlação entre todos os marcadores utilizou-se o Teste de Pearson. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o programa STATISTICA, U.S.O. (1997), e o nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$)

Resultados

4. RESULTADOS

As características clínicas referentes aos pacientes dimorfo reacionais não tratados e dimorfos em tratamento em reação reversa encontram-se nos quadros 1 e 2.

Os resultados das avaliações morfológicas, por meio de técnicas histoquímicas (HE e Faraco-Fite), dos granulomas das biópsias dos pacientes DTR e dos D-RR, encontram-se nos quadros 3 e 4, e a avaliação baciloscópica e de antígenos bacilares nas tabelas 1 e 2.

Comparando-se os quadros 3 e 4 pelo Teste de Mann-Whitney, observou-se que o grupo DTR apresentou uma maior diferenciação das células epitelióides, não havendo presença de macrófagos multivacuolados, como no grupo D-RR ($p < 0,01$).

Os resultados das avaliações imunoistoquímicas encontram-se nas tabelas 1, 2, 3, 4, 5,6 e 7.

Nas avaliações das tabelas 1 e 2, não foram notadas diferenças significativas na quantidade de antígenos entre os dois grupos, exceto pela presença de bacilos típicos (íntegros) no grupo DTR e ausência destes no grupo D-RR. Observou-se também forte correlação entre a baciloscopia, avaliada pela técnica de Faraco-Fite, e a positividade para LAM e BCG ($p < 0,05$).

Analisando-se a população linfocitária T e B e os linfócitos NK (tabelas 3, 4 e 5), notou-se que o número de linfócitos T CD8+ foi estatisticamente maior no grupo DTR ($p < 0,05$). A população de linfócitos T CD4+ também tendeu a ser maior neste mesmo grupo, bem como os linfócitos B CD20+ e CD79+, quando comparado com o grupo em

tratamento. Quanto aos linfócitos NK, foi observada tendência ao aumento do número de células no grupo DRR, em relação ao grupo não tratado.

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre a população de células IL-10+ (tabela 6) entre os dois grupos, porém observou-se correlação negativa entre a quantidade de células imunomarcadas para IL-10 e a proporção CD4/CD8 apenas no grupo dimorfo em tratamento com reação reversa ($p < 0,05$).

Na tabela 7, notou-se que o grupo dimorfo em tratamento com reação reversa mostrou maior quantidade de células iNOS+ que o grupo não tratado ($p < 0,05$).

Quadro 1— Identificação, local da biópsia, idade e sexo dos pacientes com hanseníase dimorfa tuberculóide reacional antes do início do tratamento específico

Biópsia (N=10)	Localização	Idade	Sexo
B03-3471	Tronco	24	M
S03-0440	Antebraço	84	F
B04-0347	Coxa	53	F
B03-0544	Antebraço	35	F
B03-0561	Mão	47	M
B02-2441	MSD	56	M
B02-2354	Perna	29	F
B02-1338	Coxa	43	F
B03-0578	Tronco	62	F
B02-0861	Coxa	28	M

Quadro 2— Identificação, local da biópsia, idade, sexo, tempo de tratamento e diagnóstico inicial dos pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR).

Biópsia (N=10)	Localização	Idade	Sexo	Tempo de tratamento	Diagnóstico inicial
B04-2826	Tórax	66	M	10 meses	DT
B00-1966	Antebraço	37	M	9 meses	DT
B00-4127	Braço	40	F	7 meses	VV subpolar
B04-4012	Pele	43	M	11 meses	DD
B01-3223	Fronte	25	M	8 meses	DV
B01-0580	Coxa	46	M	18 meses	VV subpolar
B00-2524	Dorso	47	M	4 meses	DT
B01-1189	Braço	50	M	5 meses	DV
B02-2415	Tórax	55	M	3 meses	DT
B02-1022	Lombar	41	M	2 meses	DD

Quadro 3 - Avaliação semiquantitativa dos achados histopatológicos das biópsias de indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de hanseníase dimorfa tuberculóide reacional antes do início do tratamento específico (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+).

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA		B03-3471	S03-0440	B04-0347	B03-0544	B03-0561	B02-2441	B02-2354	B02-1338	B03-0578	B02-0861	
Aspectos gerais	Tamanho dos granulomas	++	+++	++	++	+++	++	++	++	++	+++	
	Extensão ao interstício	++	++	+	+	+	++	++	++	+	++	
	Confluência dos granulomas	+	+	+	-	+	+	++	++	-	+	
	Edema intersticial	-	+++	-	-	-	++	-	-	-	-	
	Deposição de fibrina	+	+++	-	-	-	+	-	-	-	-	
	Necrose no derma	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	
	Agressão à epiderme	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Hiperplasia epidérmica	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
	Diferenciação	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	
	Distribuição perivascular	+	++	++	++	++	++	++	+++	++	+++	
	Entre células epitelióides	-	+	+	+	++	++	++	++	++	+	
	Quantidade	-	++	-	-	-	+	++	++	-	-	
	Tipo celular	eosinófilos	-	-	-	-	-	mastócitos	-	-	-	
	Quantidade	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Intensidade	++	++	++	++	+	+	++	-	++	+++	
Constituição dos granulomas	Imaturos	++	+	+	++	+	++	+++	++	+	++	
	Tipo Langhans	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	
	Ocorrência	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	
	Preservados	++	-	+	+	-	+	++	-	++	-	
	Granulomas endoneurais	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	Fragmentados	-	-	+	-	-	+	+++	-	-	+	
	Calibre	++	-	++	+	+	+	+	-	+	+	
	Nervos	Não identificados	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
		Identificados	++	-	+	+	-	+	-	-	++	-
		Granulomas endoneurais	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Fragmentados		-	-	+	-	-	+	+++	-	-	+	
Calibre		++	-	++	+	+	+	+	-	+	+	

Quadro 4 – Avaliação semiquantitativa dos achados histopatológicos das biópsias de indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de hanseníase dimorfa em reação reversa (DRR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+).

DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA		B04-2826	B00-1966	B00-4127	B03-4012	B01-3223	B01-0580	B00-2524	B01-1189	B02-2415	B02-1022
Aspectos Gerais	Tamanho dos granulomas	++	++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++
	Extensão ao interstício	++	++	+++	++	++	-	++	++	+	++
	Confluência dos granulomas	+	+	+++	++	+	+	++	+	++	+
	Edema intersticial	+	-	++	+	+	+	+	++	-	++
	Deposição de fibrina	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	Necrose no derma	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Agressão à epiderme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hiperplasia epidérmica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Diferenciação	+++	+++	++	+++	++	++	++	++	+++	+++
	Distribuição perivascular	++	+	+	++	+	++	++	++	++	++
	Entre células epitelióides	+	+	++	++	+	+	+	+	+	+
	Plasmócitos	-	-	+++	++	-	-	-	-	+	-
	Outras células	-	-	-	-	-	-	-	-	-	eosinófilos
	Macrófagos multivacuolados	-	-	+++	-	-	++	-	-	-	-
	Edema intracelular	++	++	+++	++	+++	++	++	+++	++	++
Gigantócitos	+++	+	+	+++	++	+	+	+++	+++	+	
Não identificados	+	-	-	++	-	+	+	-	-	+	
Nervos	Ocorrência	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Preservados	-	++	++	+	+	+	++	++	+	-
	Granulomas endoneurais	-	-	-	-	+++	+	-	-	+	-
	Fragmentados	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Calibre	-	+	+	+	++	++	++	+	+	-

Tabela 1— Análise semiquantitativa baciloscópica e de antígenos micobacterianos em biópsias cutâneas de pacientes DTR. Valores de 0 a 6+, segundo Ridley (1987).

Biópsia	Baciloscopia	LAM	BCG
B03-3471	4	4	5
S03-0440	3	4	4
B04-0347	2	2	2
B03-0544	2	2	2
B03-0561	5	6	6
B02-2441	5	6	6
B02-2354	2	2	2
B02-1338	3	4	4
B03-0578	3	3	3
B02-0861	2	2	2
Média ± DP	3,1 ± 1,2	3,5 ± 1,58	3,6 ± 1,65
Mediana	3	3,5	3,5

Tabela 2- Análise semiquantitativa baciloscópica e de antígenos micobacterianos em biópsias cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores de 0 a 6+, segundo Ridley (1987).

Biópsia	Baciloscopia	LAM	BCG
B04-2826	3	3	4
B00-1966	3	4	4
B00-4127	5	6	6
B04-4012	2	3	3
B01-3223	5	6	6
B01-0580	0	1	1
B00-2524	2	3	3
B01-1189	4	4	5
B02-2415	2	2	2
B02-1022	3	4	4
Média ± DP	2,9 ± 1,52	3,6 ± 1,58	3,8 ± 1,62
Mediana	3	3,5	4

Tabela 3– Avaliação quantitativa da população de linfócitos T por mm² nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunohistoquímicas, em biópsias cutâneas dos pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação.

Linfócito T	CD4	CD4	CD4	CD4	CD4	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD8	CD4/CD8
Localização	DERMA SUPERFICIAL	DERMA MÉDIO	DERMA PROFUNDO	CD4 TOTAL	DERMA SUPERFICIAL	DERMA MÉDIO	DERMA PROFUNDO	CD8 TOTAL	DERMA SUPERFICIAL	DERMA MÉDIO	DERMA PROFUNDO	DERMA TOTAL
DTR												
Média ± DP	432,50 ± 114,32	401,40 ± 130,28	456,20 ± 177,51	1289,90 ± 372,33	345,40 ± 61,80	311,70 ± 97,52	354,60 ± 117,20	1011,80 ± 223,01				1,29 ± 0,34
Mediana	405	430	478,50	1340	342,50	318,50	359	1004				1,26
D-RR												
Média ± DP	358 ± 53,86	384,10 ± 94,64	362,90 ± 72,47	1105 ± 161,85	260,90 ± 79,59	272,80 ± 77,83	258,90 ± 69,23	792,60 ± 144,94				1,41 ± 0,17
Mediana	382,50	386	350	1085	261	265	234	824,50				1,40

Tabela 4 - Avaliação semiquantitativa da população de linfócitos B nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunohistoquímicas, em biópsias cutâneas dos pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação. Valores expressos em + (Escala de 0 a 4+).

Linfócito B		CD20	CD20	CD20	CD20	CD79	CD79	CD79	CD79
Localização	DERMA SUPERFICIAL	DERMA MÉDIO	DERMA PROFUNDO	DERMA TOTAL	DERMA SUPERFICIAL	DERMA MÉDIO	DERMA PROFUNDO	DERMA TOTAL	DERMA TOTAL
	2 ± 0,67	2,60 ± 0,70	3,20 ± 0,42	2,70 ± 0,48	1,60 ± 0,70	2,30 ± 0,82	2,80 ± 0,79	2,40 ± 0,70	2,40 ± 0,52
DTR									
Média ± DP	2	3	3	3	1,50	2,50	3	2,50	2,50
Mediana	2	3	3	3	1,50	2,50	3	2,50	2,50
D-RR									
Média ± DP	2,10 ± 0,32	2,50 ± 0,53	2,40 ± 0,52	2,40 ± 0,52	2,10 ± 0,32	2,50 ± 0,53	2,30 ± 0,48	2,40 ± 0,52	2,40 ± 0,52
Mediana	2	2,50	2	2	2	2,50	2	2	2

Tabela 5- Avaliação quantitativa da população de células NK (CD 57+) por mm² nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR, 10 indivíduos por manifestação.

Localização	DERMA	DERMA	DERMA	DERMA	
	SUPERFICIAL	MÉDIO	PROFUNDO	TOTAL	
DTR	Média ± DP	47,10 ± 46,09	41,30 ± 32,37	45,30 ± 44,44	133,70 ± 118,99
	Mediana	37,50	35,50	28,50	90,50
D-RR	Média ± DP	104,10 ± 147,39	114,50 ± 151,74	80,40 ± 59,84	299 ± 351,20
	Mediana	57,50	70	70	207,50

Tabela 6 - Avaliação quantitativa da população de células IL-10+ por mm² nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR.

Localização	DERMA SUPERFICIAL	DERMA MÉDIO	DERMA PROFUNDO	DERMA TOTAL	
DTR	Média ± DP	28,40±21,04	23,20±22,07	14,90±12,18	66,50±50,95
	Mediana	28	12	11,50	47
D-RR	Média ± DP	30,89±12,02	22,89±8,36	11,22±6,08	65±23,12
	Mediana	30	24	12	61

Tabela 7 - Avaliação semiquantitativa da população de células iNOS+ por mm² nas diferentes regiões do derma, por meio de técnicas imunoistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes DTR e D-RR.

Localização	DERMA SUPERFICIAL	DERMA MÉDIO	DERMA PROFUNDO	DERMA TOTAL	
DTR	Média ± DP	1,75 ± 0,71	1,63 ± 0,74	1,63 ± 0,74	1,63 ± 0,74
	Mediana	2	1,50	1,50	1,50
D-RR	Média ± DP	2,50 ± 0,53	2,30 ± 0,48	1,90 ± 0,74	2,30 ± 0,48
	Mediana	2,50	2,00	2,00	2,00

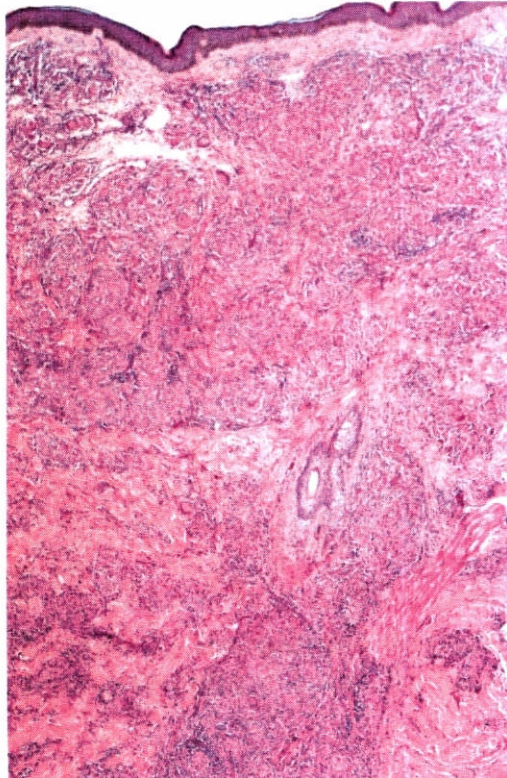


Figura 1- Biópsia B04-2826 - Quadro histológico característico: dimorfo-tuberculóide em reação reversa, mostrando granulomas de padrão tuberculóide extensos e confluentes (HE - 50x).

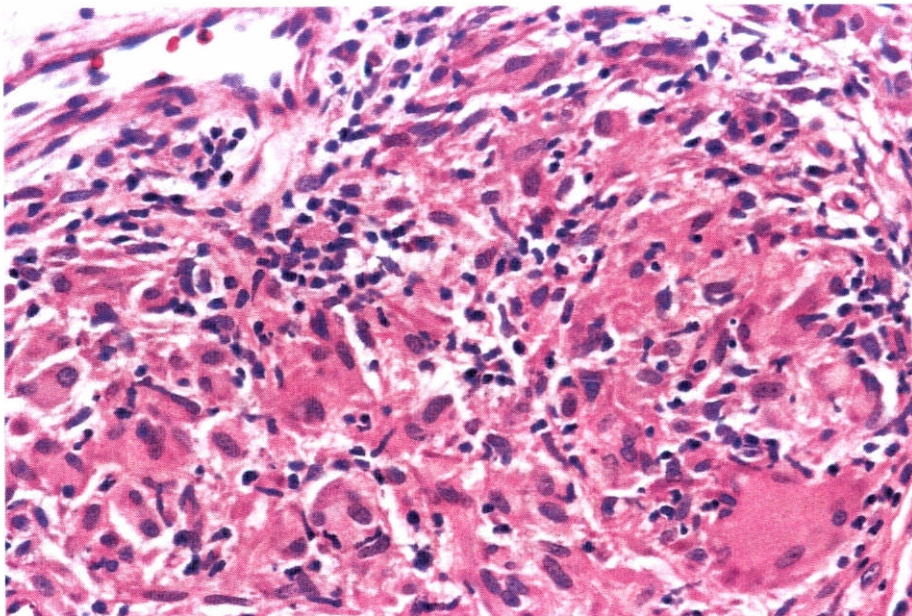


Figura 2 - Detalhe da figura 1: Granulomas de padrão tuberculóide com células epitelióides, linfócitos e célula gigante tipo Langhans (HE - 400x).

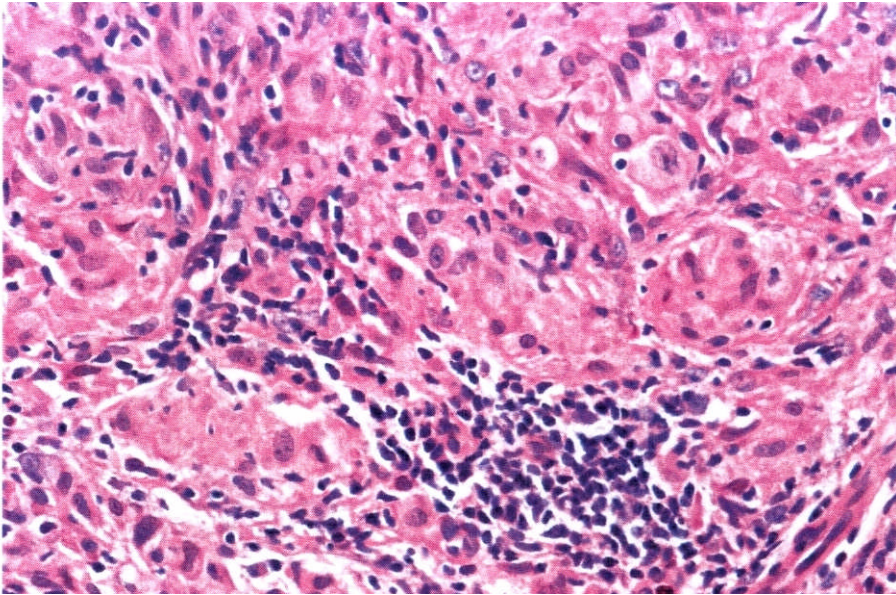


Figura 3 — Detalhe da figura 1: Granulomas de padrão tuberculóide com células epitelióides predominando e acúmulo focal de linfócitos (HE — 400x).

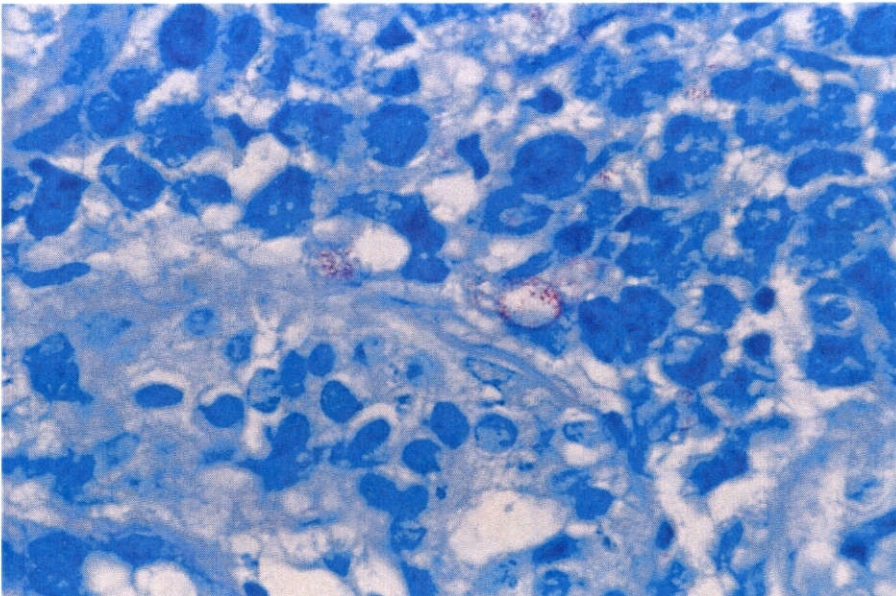


Figura 4 — Biópsia B04-2826 - Baciloscopia da biópsia típica de quadro dimorfo em reação reversa: grumos de bacilos granulosos em macrófagos vacuolizados em meio a células epitelióides (3+ na escala de Ridley) (Faraco-Fite — 1000x).

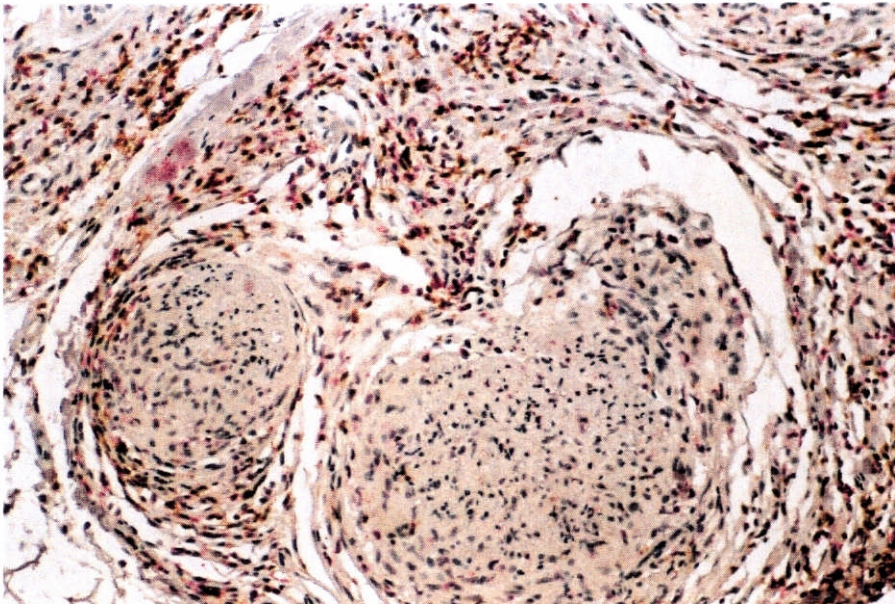


Figura 5 - Reação granulomatosa ao redor de ramos nervoso com delaminação do perineuro. Os linfócitos T CD8 coram-se em marrom e vermelho e os CD4 apenas em vermelho. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 - 200x).

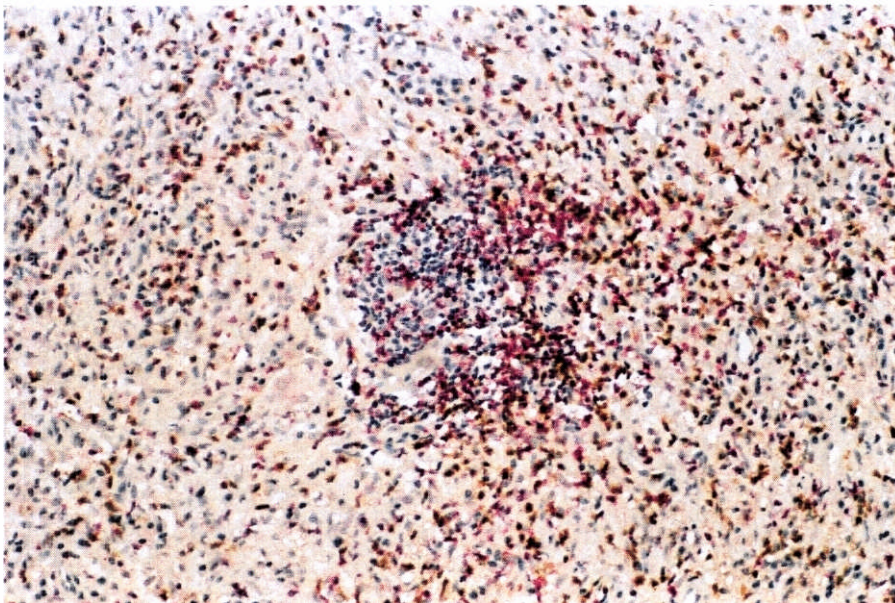


Figura 6 - Reação granulomatosa extensa mostrando linfócitos T CD4 e CD8 entremeados, com acúmulo de linfócitos B (não corados) na região central. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 - 200x).

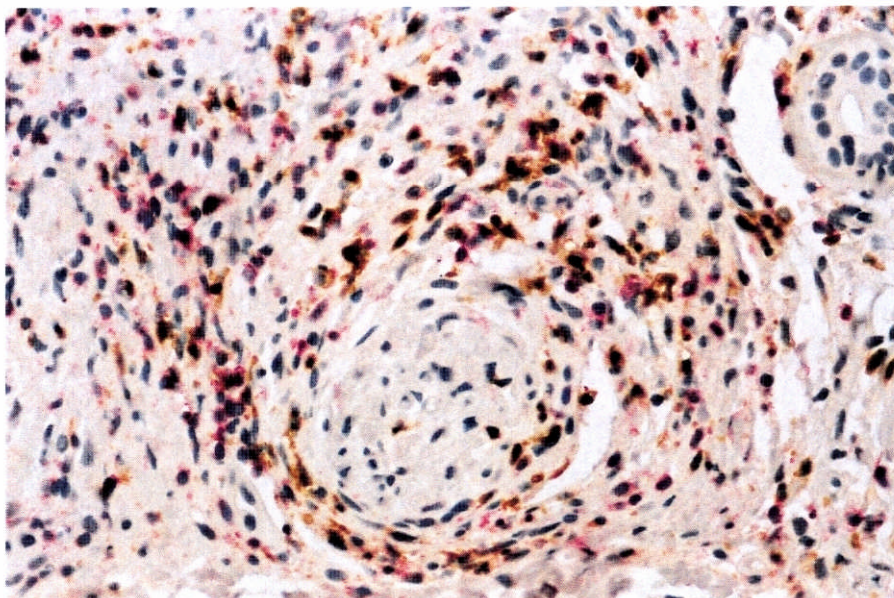


Figura 7 — Infiltrado inflamatório mostrando linfócitos T CD4 e CD8 entremeados agredindo ramo nervoso. Imunoistoquímica (Dupla coloração CD3 e CD8 — 200x).

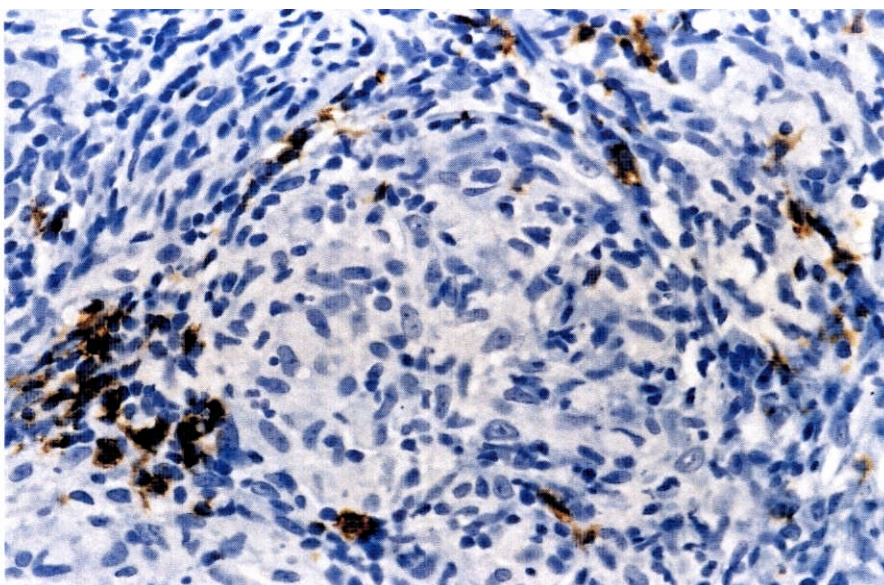


Figura 8 — Reação inflamatória granulomatosa mostrando linfócitos B em acúmulos e dispersos em meio ao granuloma. Imunoistoquímica (CD20 — 400X)

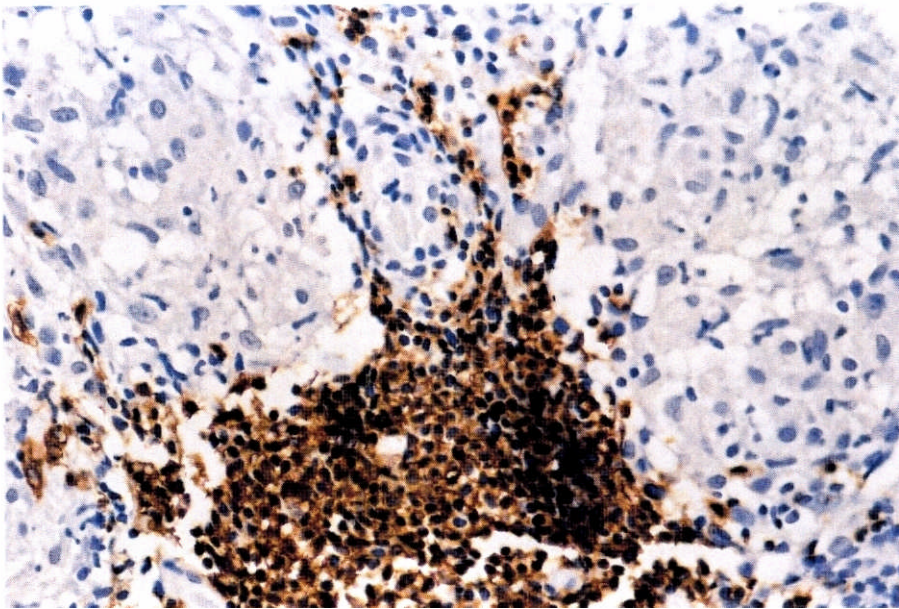


Figura 9 — Acúmulo de linfócitos B em localização perivascular na periferia de granulomas. Imunoistoquímica (CD20 — 400X).

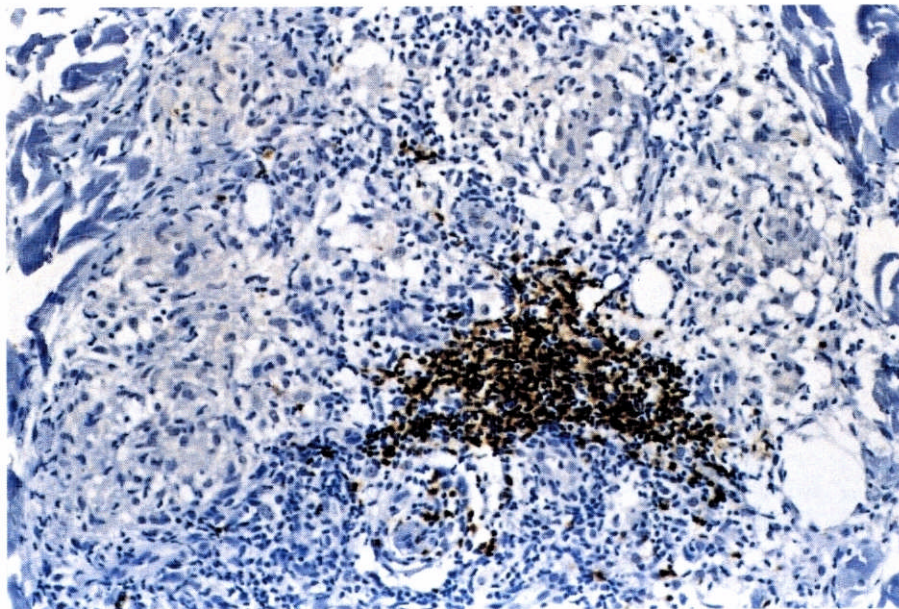


Figura 10 — Acúmulos de linfócitos B ativados e plasmócitos no derma reticular profundo. Imunoistoquímica (CD 79 — 200X).

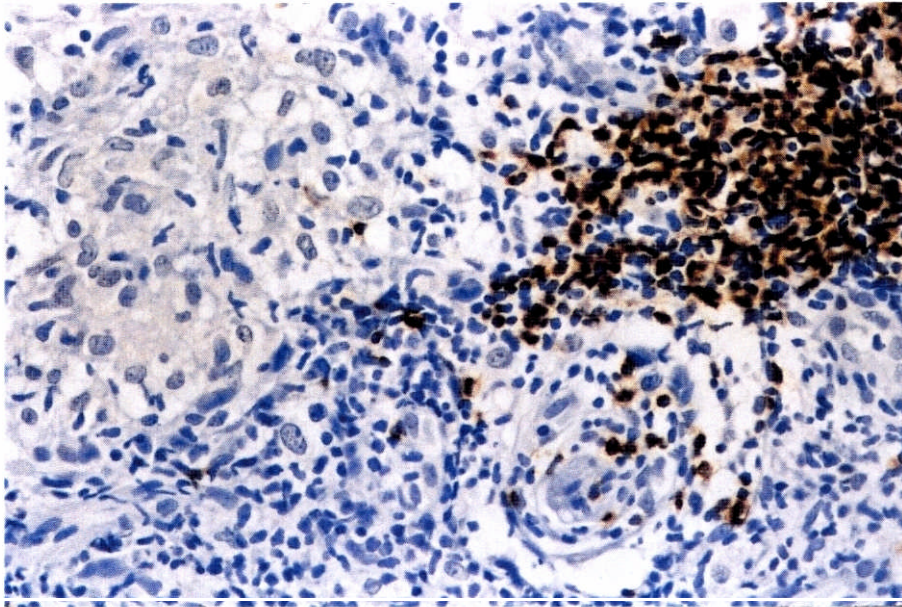


Figura 11 – Linfócitos B ativados e plasmócitos formando acúmulos na periferia de granuloma. Imunoistoquímica (CD79 – 400X).

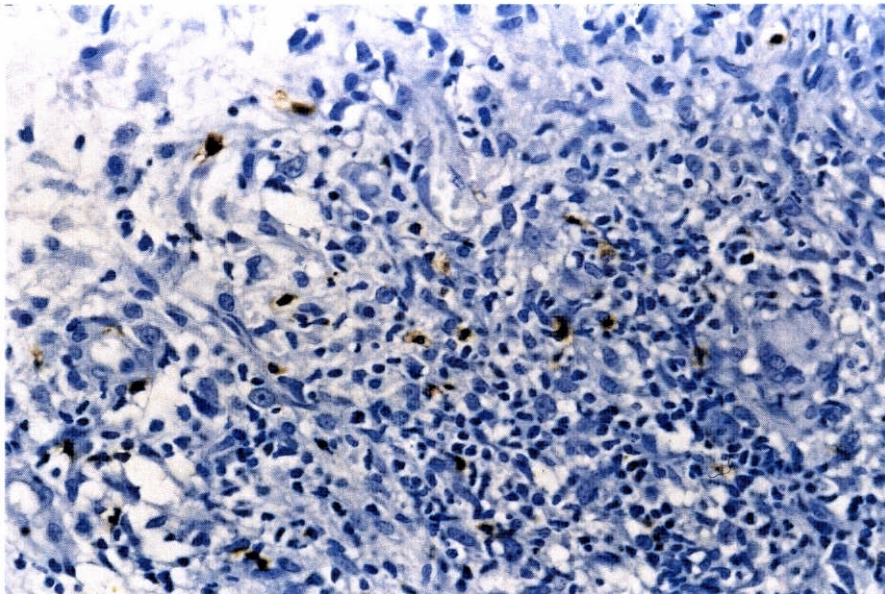


Figura 12 - Células NK dispersas em meio à reação granulomatosa. Imunoistoquímica (CD57 - 400X).

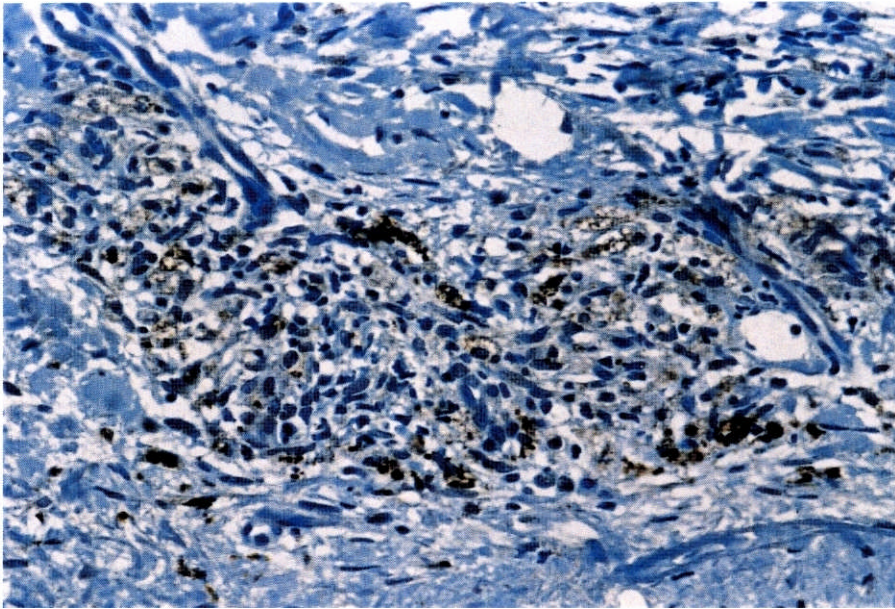


Figura 13 — Reação granulomatosa mostrando células marcadas positivamente para a enzima óxido nítrico sintase induzível (3+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (iNOS — 400X)

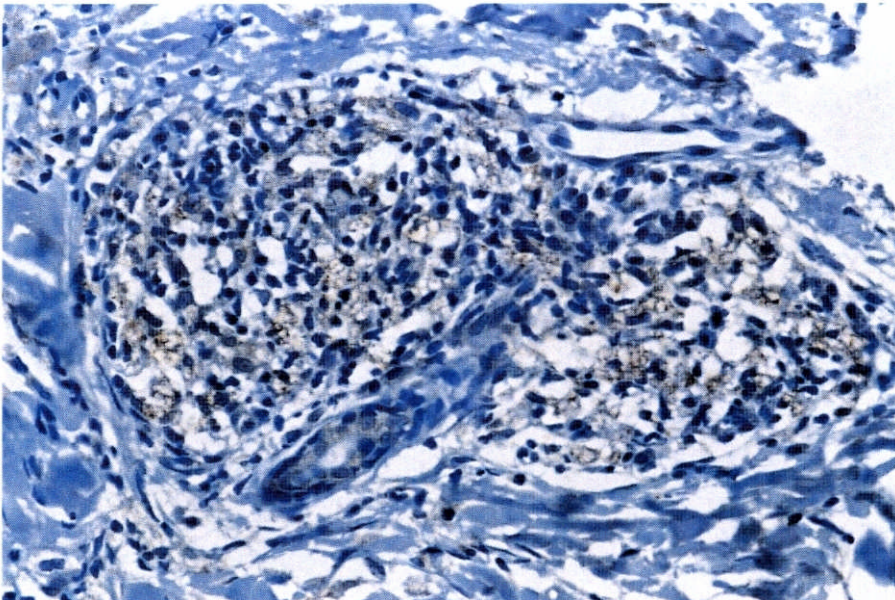


Figura 14 — Reação granulomatosa perivascular mostrando menor intensidade na marcação para iNOS (1+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (iNOS — 400X).

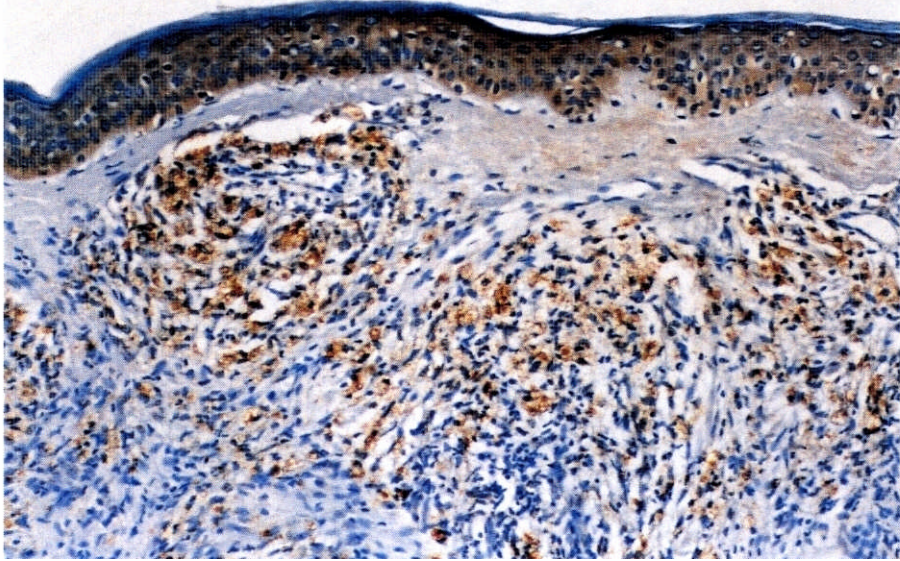


Figura 15 — Macrófagos contendo grande quantidade de lipoarabinomanana no derma superficial (5+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (LAM — 200X).

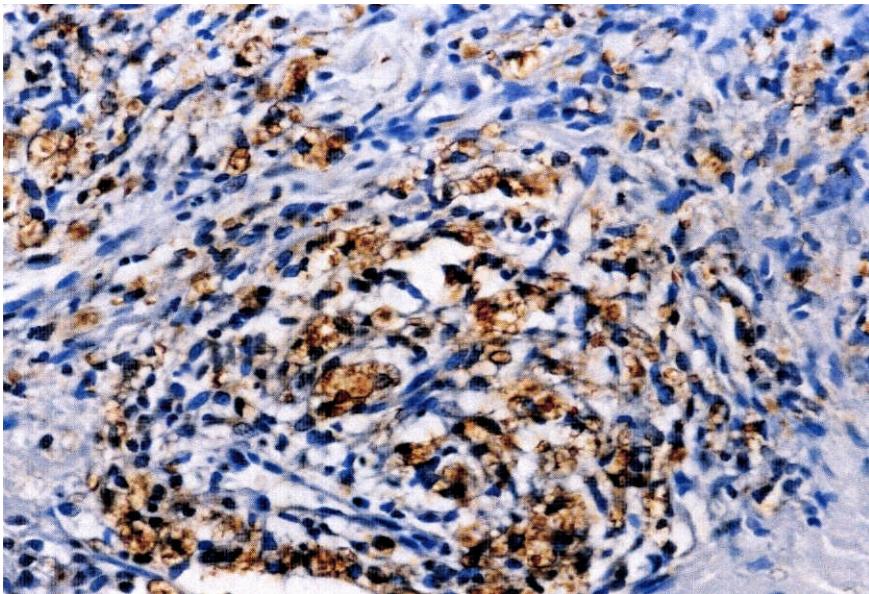


Figura 16 — Detalhe da figura 15: Macrófagos contendo grande quantidade de lipoarabinomanana superficial (5+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (LAM — 400X).

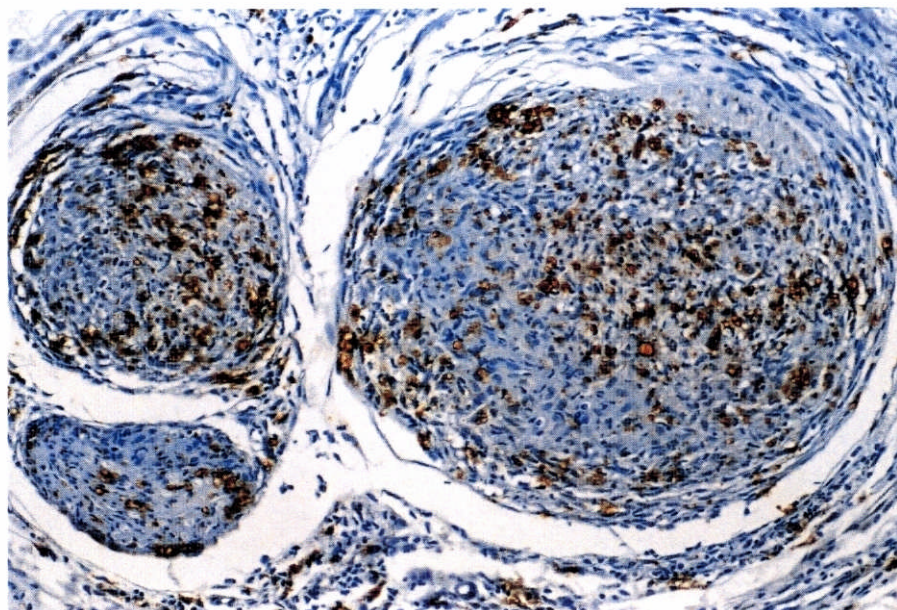


Figura 17 — Ramo nervoso do derma profundo mostrando forte marcação para anticorpo anti-*Mycobacterium bovis* (6+ na escala semiquantitativa). Imunoistoquímica (BCG — 200X).

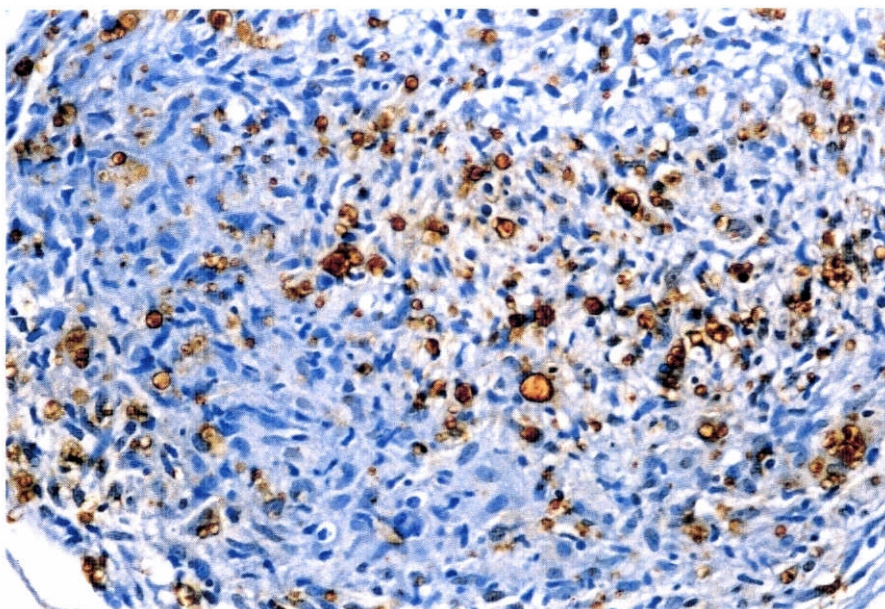


Figura 18 — Detalhe da figura acima mostrando intensa marcação dentro do ramo nervoso. Imunoistoquímica (BCG — 400X).

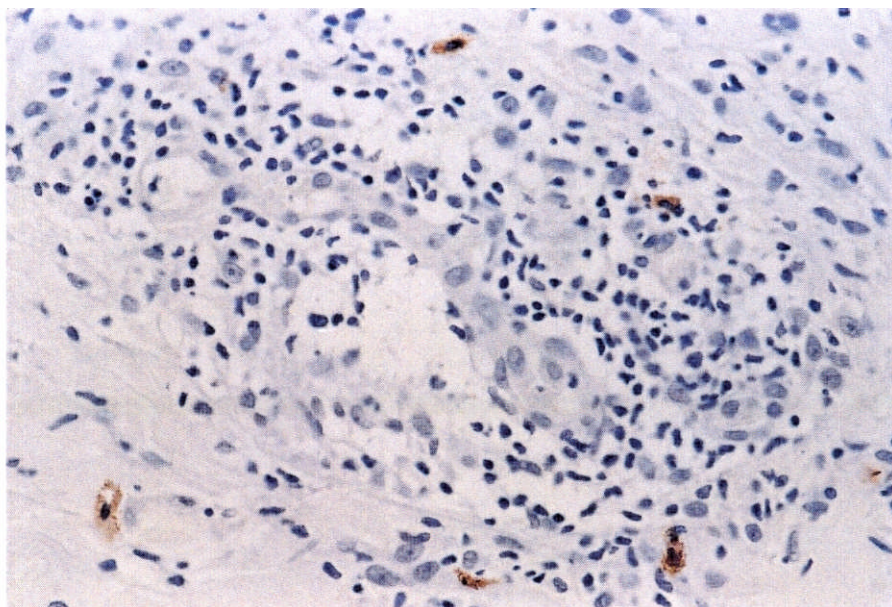


Figura 19 - Células mononucleares imunomarcadas para IL-10 em meio ao infiltrado linfo-histiocitário perivascular. Imunoistoquímica (IL-10 - 400X).

Discussão

5. DISCUSSÃO

Naafs e Wheate⁹⁶ referem que a reação tipo 1 espontânea, ou seja, antes do tratamento específico da hanseníase, ocorre em 51% dos indivíduos dimorfos. Lockwood¹¹⁵ também afirma que essas reações podem ser independentes do tratamento, e as considera próprias dos indivíduos dimorfos. Na era pré-sulfônica, antes de existir qualquer tratamento específico, havia indivíduos que desenvolviam episódios reacionais, com lesões de estrutura tuberculóide, as quais podiam evoluir naturalmente para cura, ou então modificavam suas características clínicas e histopatológicas a cada episódio no sentido do pólo virchoviano 99.

Avaliando as características histopatológicas das reações tipo I em 66 indivíduos, Trindade⁹⁰ encontrou nove casos onde as manifestações ocorreram antes do tratamento.

As reações tipo 1 durante o tratamento são referidas desde Lauro de Souza Lima⁹⁹, que as denominava de pseudoexacerbação. Nos trabalhos básicos sobre sua classificação, Ridley & Jopling^{11, 12}, já referem as reações na evolução do grupo dimorfo, definindo "downgrading" e "upgrading". Esta última foi também denominada reação reversa, por significar reversão para um quadro clínico e estrutural mais tuberculóide. Jopling⁹⁸ cunhou o termo reação tipo 1 para diferenciá-la da reação tipo eritema nodoso hansênico (reação tipo 2), que ocorre nos virchovianos e está ligada à imunidade humoral.

Roche *et al*¹¹⁶ descreveram reações tipo I em 42 de 136 indivíduos portadores de hanseníase dimorfa durante o tratamento, as quais foram mais frequentes nos DD (46%) e DV (39%) que nos DT (20%).

Trindade⁹⁰ descreve que, nos indivíduos inicialmente diagnosticados como DT, DT reacional, DD e DD reacional, quase todos os episódios reacionais durante ou após o tratamento mostraram padrão DT. Já naqueles com diagnóstico inicial de DV ou VV subpolar, os episódios reacionais dividiram-se entre estrutura DT ou DD, sendo que um dos indivíduos deste

último grupo apresentou, num novo episódio reacional subsequente, um padrão DT.

Há fortes evidências de que a reação tipo 1 seja uma reação de hipersensibilidade tardia a antígenos bacilares 4, 98, 117. Bjune *et al*¹¹⁸ evidenciaram níveis elevados nos testes de transformação linfocitária (LTT) e nos testes de inibição da migração dos linfócitos (LIMT) durante as reações reversas. Godal *et al*¹¹⁷ avaliaram vários parâmetros imunológicos em indivíduos DT, que através de reações tornaram-se mais tuberculóides, e demonstraram estatisticamente aumentos significativos dos valores de LTT e LIMT, sendo que na maioria a reação de Mitsuda foi positiva e precedida por reação de Fernandes em torno de 3 cruces.

Raciocinando em termos de patologia geral e estabelecendo-se analogia com outras doenças infecciosas granulomatosas, como a tuberculose e paracoccidioidomicose, pode-se sugerir que a hipersensibilidade mediada por células se desenvolve quando um indivíduo com imunidade celular preservada defronta-se com uma carga antigênica elevada. Assim, uma reação tipo 1 que se desenvolve antes do início do tratamento dependeria da exposição de carga bacilar elevada a um sistema imune constitucionalmente resistente. Durante o período de incubação da hanseníase, altos níveis de antígenos bacilares poderiam decorrer da contaminação do indivíduo por doses infectantes elevadas, por um déficit dos mecanismos de defesa natural, ou por deficiência da imunidade inata³⁷.

Ridley sugere que os quadros tuberculóides reacionais, aos quais denomina tuberculóides secundários, desenvolver-se-iam a partir de retardo no reconhecimento antigênico, o que provavelmente implicaria em acúmulo de cargas antigênicas antes do reconhecimento imune⁷.

As reações tipo 1 que aparecem durante o tratamento específico pressupõem prévia degradação ("downgrading"), o que é próprio dos dimorfos não tratados. Esta degradação estaria ligada à capacidade imunecelular parcial do indivíduo constitucionalmente dimorfo, que não conseguiria impedir a proliferação bacilar progressiva. Isto alteraria,

conseqüentemente, as características dos macrófagos e da reação granulomatosa, e as lesões cutâneas se tornariam mais extensas, confluentes e generalizadas. Opromolla ¹¹⁹ sugere que esta evolução se processa sem alterar constitucionalmente a imunidade celular, embora se saiba que cargas antigênicas elevadas de agentes etiológicos atóxicos deprimam a imunidade celular ¹²⁰, no intuito de manter a homeostase.

Por quê o tratamento, em geral num período médio de 6 meses ^{96, 116} pode propiciar à reação reversa? Por quê há indivíduos que se curam sem apresentar reação e outros que só a apresentam após a alta medicamentosa? Opromolla ¹⁰⁶ sugere que toda a reação tipo 1 é desencadeada como resposta a proliferação bacilar, provavelmente de bacilos persistentes. A favor desta hipótese, verifica-se que não há diferenças clínicas ou estruturais entre reação reversa e recidiva, a não ser pela presença de bacilos típicos na última condição ^{90,108}. Descartando-se proliferação bacilar, que mecanismos poderiam ser responsáveis pela ocorrência da reação reversa? Esta questão é de difícil resposta, pois falta um modelo experimental para hanseníase, mas a comparação dos padrões histológicos e de população celular (definida pela imunistoquímica) entre biópsias de indivíduos dimorfos com reação tipo 1 antes do início do tratamento e durante o tratamento constitui uma abordagem interessante para o entendimento das reações tipo 1.

Nos dois primeiros quadros estão explicitadas as características clínicas dos pacientes dimorfos apresentando quadro clínico de reação tipo 1 antes do tratamento, constituindo o grupo DTR, ou com manifestações reacionais compatíveis com reação reversa durante o tratamento com poliquimioterapia (DRR).

No quadro 2, expõe-se o diagnóstico prévio ao tratamento (a maioria com comprovação histopatológica) dos 10 casos dimorfos que apresentaram reação tipo I durante o tratamento e o tempo decorrido entre o início do tratamento e o episódio reacional. Com exceção do indivíduo cuja biópsia foi B01-0580, o qual apresento longa evolução com episódios alternados de

reação reversa, eritema nodoso hansênico e recidiva, os pacientes restantes desenvolveram episódios de reação tipo I entre 4 e 11 meses a partir do início do tratamento, com média de 6,6 meses, correspondendo aos achados encontrados por Naafs e Wheate⁹⁶ e Roche *et al*¹¹⁶.

Analisando-se o quadro 3 (DTR antes do tratamento), observa-se que apenas quatro biópsias mostraram alterações exsudativas e necróticas, referidas nas reações tipo 1 de grande intensidade. A maior parte das biópsias apresentava, como evidências reacionais, maior extensão dos granulomas, edema intracitoplasmático em células epitelióides bem diferenciadas e número variável de células gigantes do tipo corpo estranho. O componente linfocitário nos granulomas mostrou valores moderados na análise semiquantitativa, e houve predomínio da disposição destas células ao longo dos vasos sobre a localização em meio às células epitelióides. Os quadros reacionais resolutivos, com alterações agudas exuberantes, focos de necrose e ulceração, são próprios dos tuberculóides reacionais (ou tuberculóides secundários, segundo Ridley⁷).

Analisando-se os quadros 3 e 4, onde são expostos os dados histopatológicos dos dois grupos, observa-se que não há diferenças consistentes entre eles. Todas as biópsias mostram granulomas com células epitelióides, gigantocitos imaturos do tipo corpo estranho e linfócitos, dando ao conjunto caráter tuberculóide. Os granulomas são, em geral, extensos, mal-delimitados e confluentes, observando-se graus variados de edema intersticial e intracelular, e isto define quadro reacional. O único achado diverso ($p < 0,05$) entre os dois grupos foi a presença de macrófagos multivacuolados em três biópsias (B00-4127, B01-0580 e B01-3223) do grupo dimorfo em reação reversa durante o tratamento, cujos diagnósticos prévios ao tratamento foram VV subpolar, VV subpolar e DV, respectivamente. Este achado histopatológico confirma que estes indivíduos sofreram degradação na sua evolução prévia ao tratamento, assumindo características histopatológicas próprias dos VV ou DV, com formação de células de Virchow. O encontro destas células multivacuoladas dentro dos granulomas de padrão epitelióide permite o diagnóstico de reação reversa

independentemente do conhecimento dos dados clínicos ou das biópsias prévias, embora a não detecção destas células em biópsias de reação reversa não afaste degradação prévia. A propósito, em um dos trabalhos pioneiros sobre reação reversa, Lauro de Souza Lima ⁹⁷, que a designou como pseudoexacerbação, refere que o quadro granulomatoso reacional poderia se instalar sobre lesões previamente existentes ou sobre pele aparentemente normal.

Analisando-se os dados das baciloscopias das biópsias (Tabelas 1 e 2), verifica-se que apenas na biópsia B01-0580, que corresponde a um quadro reacional em paciente com longa evolução e tratamento, a baciloscopia é negativa. Todos os DTR apresentaram baciloscopia positiva, e em dois deles com índice de 5 cruces na escala de Ridley. Isto não afasta o diagnóstico de DTR, pois os dimorfos são instáveis e sujeitos à proliferação bacilar progressiva. Índices baciloscópicos elevados poderiam preceder as modificações morfológicas dos granulomas ("downgrading"). No grupo dimorfo em reação reversa, os maiores índices baciloscópicos (8004127 e B01-3223) correspondiam a indivíduos cujos diagnósticos iniciais foram VV subpolar e DV, respectivamente. Estes casos mostraram evidências de degradação prévia. A manutenção dos altos índices baciloscópicos em 9 das biópsias de dimorfos em reação reversa é compatível com o curto período de tratamento, uma vez que por meio da poliquimioterapia há rápida morte e fragmentação bacilar, mas o "clearance" bacilar é lento. Para os virchovianos, este é da ordem de uma cruz (na escala logarítmica) por ano.

O encontro de bacilos típicos nos granulomas dos pacientes DTR, na presença de células epitelióides e linfócitos, indica que estes pacientes provavelmente estão sofrendo degradação ("downgrading"), o que é próprio de sua condição. Não há, pois, diferenças morfológicas clínicas (características das lesões) ou histopatológicas consistentes nas colorações de rotina (hematoxilina-eosina e Faraco-Fite), afora a maior diferenciação das células epitelióides e a presença de bacilos típicos no grupo DTR, já que todas estas lesões representam quadros reacionais de padrão tuberculóide.

A imunistoquímica anti-BCG e anti-LAM demonstrou positividade constante, com resultados sugerindo forte correspondência com a coloração de Faraco-Fite, não havendo diferenças estatísticas entre os dois grupos. Porém, houve diferenças quanto ao índice morfológico, pois só no grupo não tratado (DTR) foram encontrados bacilos típicos. A este respeito, há um fato interessante de observação clínica e que ficou patente no trabalho de Trindade⁹⁰. Alguns indivíduos com hanseníase indeterminada, apesar do tratamento específico bem orientado, evoluíam para hanseníase tuberculóide. Esta observação levanta a hipótese de que a morte e conseqüente fragmentação bacilar é que estimularia a reatividade imune celular adquirida. Sabe-se que bacilos viáveis produzem e secretam LAM e PGL-1, que inibem a resposta imunecelular, o que pode induzir tolerância imune. Nesse sentido, em pacientes DTR não tratados, embora haja uma fração importante de bacilos mortos (fragmentados), há também bacilos típicos, ou viáveis que, ao proliferarem progressivamente, induziriam mecanismo de imunossupressão, contrapondo-se a reatividade imune celular a antígenos derivados da morte e fragmentação bacilar. Estes antígenos poderiam estimular reações Th1, porém seriam insuficientes para suplantar a imunossupressão gerada pela replicação bacilar, levando a maioria dos indivíduos do grupo DTR com o tempo a tender à piora baciloscópica e estrutural (quadro 2). Uma vez instalado o tratamento, a ação medicamentosa destruiria os bacilos viáveis e metabolicamente ativos, liberando quantidades progressivamente maiores de antígenos, criando condições para reversão da imunossupressão e desencadeamento de reações mais intensas e quadro estrutural mais tuberculóide⁷¹.

Este raciocínio, como já dissemos, tem base em fatos de observação clínica e experimental, e suscita algumas questões, como qual seria o gatilho para o desenvolvimento da reação tipo 1, e por quê alguns dimorfos não apresentam reações. Para tentar contribuir para o esclarecimento destas questões, realizamos também a avaliação da população celular e de

parâmetros representativos da resposta imune celular, como a iNOS, IL-10 e a avaliação de antígenos bacilares, em nosso material.

Belone ¹²¹ estudou comparativamente 40 casos de pacientes na faixa tuberculóide virgens de tratamento (10 TT, 10 DT, 10 DT reacionais antes do tratamento e 10 Tuberculóides reacionais antes do tratamento), e não achou o padrão classicamente descrito por Modlin ⁵⁰ de distribuição linfocitária nos granulomas, ou seja, linfócitos T CD4+ no centro do granuloma e CD8+ na periferia. Em todos os seus casos, linfócitos T CD4+ e CD8+, linfócitos B CD20+ e CD79+, bem como células NK, entremeavam-se tanto nos halos quanto dentro dos granulomas. Também a proporção de linfócitos T CD4/CD8 em seus casos foi menor do que a classicamente descrita por este mesmo autor (2:1), com valores médios entre 1,6:1 nos Tuberculóides reacionais e 1,3:1 nos DT reacionais. Da mesma forma que Atkinson ¹¹², encontrou níveis aumentados tanto de substâncias pró-inflamatórias (iNOS) quanto de citocinas anti-inflamatórias (IL-10), indicando tentativa de manutenção da homeostase após desequilíbrio imunológico. Em nosso material, a disposição dos linfócitos, bem como a proporção de linfócitos T CD4+/CD8+, e a presença de IL-10 nos dois grupos DTR e D-RR, mostraram resultados semelhantes.

Comparando-se os achados imunoistoquímicos entre os dois grupos, observa-se que os valores de IL-10 não mostraram diferenças significativas. Porém, há no primeiro grupo (DTR) maior quantidade de linfócitos T CD8+ ($p < 0,05$), tendência à maior quantidade de células da imunidade adaptativa (linfócitos T CD4+, linfócitos B CD20+ e CD79+), na presença de bacilos viáveis e menor quantidade de células imunomarcadas para iNOS ($p < 0,05$). Isto sugere imunidade adaptativa presente, porém com desvio para perfil Th2. Nesse caso, a função da IL-10 seria de supressão da imunidade celular.

Em relação ao segundo grupo (D-RR), os valores de iNOS em relação aos pacientes DTR, indicam uma hipersensibilidade prévia mais efetiva nesses pacientes tratados, porém a tendência de menor quantidade de células da imunidade adaptativa e tendência de aumento de células NK, bem

como a correlação negativa entre IL-10 a proporção de linfócitos T CD4/CD8 são mais sugestivos de resposta moduladora com desvio para a imunidade não específica.

O maior problema na interpretação dos achados histopatológicos e imunoistoquímicos na hanseníase é que, ao se exteriorizarem as lesões clínicas, a maior parte dos fenômenos imunobiológicos já se desenvolveu. Mesmo assim, as reações tipo 1 permanecem por meses, ou porque sua resolução é demorada, ou porque os estímulos que lhe deram origem ainda permanecem. A necessidade de desarmar estas reações para manter a homeostase explica a coexistência de padrões de resposta Th1 e Th2/Th3 em biópsias de lesões reacionais do tipo 1, como se verificam neste estudo e nos trabalhos de Belone¹²¹ e Atkinson¹¹².

Conclusões

6. CONCLUSÕES

- a. A presença de grupamentos de macrófagos multivacuolados (células de Virchow) em meio às células epitelióides, em biópsias de reação tipo 1, é indicativa de que este indivíduo portador de hanseníase dimorfa sofreu prévia degradação em direção ao pólo virchoviano.
- b. A presença de bacilos típicos no interior de granulomas de padrão DTR em lesão estabelecida é a marca da resistência imune parcial destes indivíduos, os quais são incapazes de destruir e processar todos os bacilos. É provável que a permanência e progressiva proliferação destes bacilos típicos, pelas modificações imunossupressoras que induzem nos granulomas e que resultam no aumento do número e extensão das lesões cutâneas, seja responsável pela degradação dos dimorfos no sentido do pólo virchoviano.
- c. Não há diferenças morfológicas consistentes entre os granulomas DTR e D-RR, sugerindo mecanismos imunes semelhantes para o desenvolvimento das reações tipo 1.
- d. Como já relatado em trabalhos prévios, demonstrou-se coexistência de padrões Th1 e Th2/Th3 nas biópsias de lesões de pacientes dimorfos com reação tipo 1, sugerindo que sempre há necessidade de resposta moduladora, a qual pode se tornar imunossupressora, caso haja a influência local da imunossupressão induzida pelo bacilo.
- e. As diferenças encontradas nos estudos imunoistoquímicos, entre os dois grupos estudados, na população celular e no número de células imunomarcadas para iNOS e IL-10, sugere que no primeiro grupo (DTR) a IL-10 teria um papel imunossupressor, devido à proliferação progressiva de bacilos íntegros. Já no grupo D-RR, na ausência de bacilos viáveis, a IL-10 atuaria como imunomoduladora, desarmando a imunidade adaptativa e desviando para a resposta inespecífica. Assim, a reação tipo 1 em paciente dimorfo representa uma

manifestação da imunidade celular, embora essa possa ocorrer de forma desequilibrada, gerando destruição tecidual, principalmente em nervos. Para a manutenção da homeostase, o organismo lança mão dos mecanismos reguladores, como a IL-10. Havendo bacilos viáveis e incapacidade do sistema imune de destruí-los, esta tentativa de regulação acaba convertendo-se em imunossupressão (DTR). Caso todos os bacilos sejam mortos, a regulação faz com que a resposta adaptativa seja progressivamente substituída pela resposta inespecífica, autolimitando a reação e evoluindo para a cura.

Referências

Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Shepard CC, McRae DH. *Mycobacterium leprae* in mice: minimal infectious dose, relationship between staining quality and infectivity, and effect of cortisone. J Bacteriol 1965; 89:365-72.
2. Rees RJW, Young DB. The microbiology of leprosy. In: Hastings, RC, editor. Leprosy, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.49-83.
3. Srinivasan H. Disability deformity and rehabilitation. In: Hastings, RC, editor. Leprosy, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.411-47.
4. Harboe M. Overview of host-parasite relations. In: Hastings, RC, editor. Leprosy, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.87-112.
5. Newell KW. An epidemiologist's view of leprosy. Bulletin of the World Health Organization 1966; 34:827-57.
6. Job CK. Pathology of leprosy. In: Hastings, RC, editor. Leprosy, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.193-224.
7. Ridley DS. Skin biopsy in leprosy, 2nd ed. Switzerland: CIBA-GEIGY; 1987.
8. Rabello FE. Clinical aspects: The polar concept. In: Latapi F, Saúl A, Rodriguez O, Browne SG. Leprosy. Proceedings of the XI International Leprosy Congress. Amsterdam: Excerpta Médica; 1978. p. 63-7.

9. Fleury RN. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling — uma análise morfológica. *Hans Int* 1989; 14(2):101-6.
10. Pfaltzgraff RE, Ramu G. Clinical Leprosy. In: Hastings, RC, editor. *Leprosy*, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p. 237-87.
11. Ridley DS, Jopling WH. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr Rev* 1962; 33:119-28.
12. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity - a five- group system. *Int J Lepr* 1966; 34:255-73.
13. Krahenbuhl JL, Adams LB. The role of the macrophage in resistance to the leprosy bacillus. *Immunol Ser* 1994; 60:281-302.
14. Kirchheimer WF, Storrs EE. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus Linn.*) as a model for the study of leprosy. *Int J Lepr* 1971; 39:693-702.
15. Meyers WM, Gormus BJ, Walsh GP. Experimental leprosy. In: Hastings, RC, editor. *Leprosy*, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.385-410.
16. Hunter SW, Brennan, PJ. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. *J Bacteriol* 1981; 147:728-35.
17. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific antigen of *Mycobacterium leprae*. *J Biol Chem* 1982; 257:15072-8.

18. Neill MA, Klebanoff SJ. The effect of phenolic glycolipid-I from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. J Exp Med 1988; 167:30-42.
19. Vachula M, Worobec S, Andersen BR. A comparison of monocyte oxidative responses in leprosy patients and healthy subjects as influenced by mycobacterial lipid treatment. Int J Lepr 1990; 58:534-9.
20. Silva CL, Faccioli LH, Foss NT. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae*. Int J Lepr 1993; 61(1):107-8.
21. Mehra V, Brennan PJ, Rada E, Convit J, Bloom BR. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique M. *leprae* glycolipid. Nature 1984; 308:194-6.
22. Prasad HK, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of *in vitro* concanavalin A responses unrelated to leprosy type. J Exp Med 1987; 165:239-44.
23. Roitt I, Brostoff J, Male D. Imunidade as bactérias e aos fungos. In: Imunologia 5ª ed. São Paulo:Manole; 1999. p.229-42.
24. Lockwood DNJ, Colston MJ, Khanolkar-Young SR. The detection of *Mycobacterium leprae* protein and carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. Am J Trop Med Hyg 2002; 66(4):409-15.
25. Van den Bos IC, Khanolkar-Young S, Das PK, Lockwood DNJ. Immunohistochemical detection of PGL-1, LAM, 30kD and 65 kD

- antigens in leprosy infected paraffin preserved skin and nerve sections. *Lepr Rev* 1999; 70:272-80.
26. Verhagen CE, Faber W, Klatser P, Buffing A, Naafs B, Das PK. Immunohistological analysis of *in situ* expression of mycobacterial antigens in skin lesions of leprosy patients across the histopathological spectrum. Association of mycobacterium lipoarabinomannan (LAM) and *Mycobacterium leprae* phenolic glycolipid-I (PGL-I) with leprosy reactions. *Am J Pathol* 1999; 154:1793-804.
27. Narayanan RB, Girdhar BK, Malaviya GN, Sengupta U. *In situ* demonstration of *Mycobacterium leprae* antigens in leprosy lesions using monoclonal antibodies. *Immunology Lett* 1990; 24:179-84.
28. Wang T, Izumi S, Butt KI, Kawatsu K, Maeda Y. Demonstration of PGL-1 and LAM-B antigens in paraffin sections of leprosy skin lesions. *Jpn J Leprosy* 1992; 61:161-74.
29. Shetty VP, Uplekar MW, Anita NH. Immunohistological localization of mycobacterial antigens within the peripheral nerves of treated leprosy patients and their significance to nerve damage in leprosy. *Acta Neuropathol* 1994; 88:300-6.
30. Natrajan M, Katoch K, Katoch VM. Histology and immuno-histology of lesions clinically suspicious of leprosy. *Acta Leprologica* 1999; 11(3):93-8.
31. Takashashi MD, Anrade Jr HF, Wakamatsu A, Siqueira S, De Brito T. Indeterminate leprosy: histopathological and histochemical predictive parameters involved in its possible change to paucibacillary or multibacillary leprosy. *Int J Lepr* 1991; 59(1):12-9.

32. Barbosa Jr AA, Silva T C, Patel BN, Santos MIR, Wakamatsu A, Alves VAF. Demonstration of mycobacterial antigens in skin biopsies from suspected leprosy cases in the absence of bacilli. *Path Res Pract* 1994; 190:782-5.
33. Schettini APM, Ferreira LCL, Milagros R, Schettini MCA, Pennini SN, Rebello PB. Enhancement in the histological diagnosis of leprosy in patients with only sensory loss by demonstration of mycobacterial antigens using anti-BCG polyclonal antibodies. *Int J Lepr* 2001; 69(4):335-40.
34. Fakhouri R, Sotto MN, Manini MIP, Margarido LC. Nodular leprosy of childhood and tuberculoid leprosy: a comparative, morphologic, immunopathologic and quantitative study of skin tissue reaction. *Int J. Lepr* 2003; 71(3):218-26.
35. Pagliari C, Duarte MIS, Sotto MN. Pattern of mycobacterial antigen detection in leprosy. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1995; 37(1):712.
36. Kutzner H, Argenyi ZB, Requena L, Rütten A, Hügel H. A new application of BCG antibody for rapid screening of various tissue microorganisms. *J Am Acad Dermatol* 1998; 38(1):56-60.
37. Mims CA. *The pathogenesis of infectious diseases*, 2nd ed. London:Academic Press; 1982.
38. Modlin RL. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 2002; 15:1-6.

39. Roitt I, Brostoff J, Male D. Células Envolvidas nas Respostas Imunes. In: *Imunologia* 5ª ed. São Paulo: Manole; 1999. p.13-30.
40. Goldsby RA., Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Imunologia* 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002. p.239-67.
41. Kaufmann SHE. Cell-mediated immunity. In: Hastings, RC, editor. *Leprosy*, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.157-68.
42. Modlin RL, Rea, TH. Immunopathology of leprosy. In: Hastings, RC, editor. *Leprosy*, 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.225-34.
43. Ernst WA, *et al.* Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunol* 2000; 165:7102-8.
44. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol* 1994; 102:828-32.
45. Garcia VE, *et al.* IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J Immunol* 1999; 162(10):6114-21.
46. Trincheri G, Matsumoto-Kobayashi M, Clark SC, Sheera J, London L, Perrussia B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin-2. *J Experiment Med* 1984; 60:1147-69.
47. Cuturi MC, *et al.* Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Experiment Med* 1989; 69:569-83.

48. Chan SH, *et al.* Induction of γ -IFN production by NK cell stimulatory factor (NKSF): characterization of the responder cells and synergy with others inducers. *J Experiment Med* 1991; 173(4):869-79.
49. Romagnani S. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the "natural" immune response? *Immunol Today* 1992; 13(10):37981.
50. Modlin RL, Hofman FM, Taylor CR, Rea TH. T lymphocyte subsets in the skin lesion of patients with leprosy. *J Am Acad Dermatol* 1983; 8:182-9.
51. Narayanan RB, Bhutani LK, Sharma AK, Nath I. T cell subsets in leprosy lesions: *in situ* characterization using monoclonal antibodies. *Clin Exp Immunol* 1983; 51:421-9.
52. Kato H, Sanada K, Koseki M, Ozawa T. Identification lymphocyte subpopulations in cutaneous lesions of leprosy. *Jpn J Leprosy* 1983; 52:126-32.
53. Modlin RL, *et al.* Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:1213-7.
54. De la Barrera S, *et al.* NK cells modulate the cytotoxic activity generated by *Mycobacterium leprae-hsp65* in leprosy patients: role of IL-18 and IL-13. *Clin Exp Immunol* 2004; 135(1): 105-13.
55. Mosmann TR, Cherwinsky H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I - Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; 136(7): 2348-57.

56. Yamamura M, *et al.* Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; 254(5029): 2779.
57. Sieling PA, Modlin RL. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. *Springer Semin Immunopathol* 1992; 13:413-26.
58. Sieling PA, Modlin RL. T Cytokine patterns in leprosy. *Ann NY Acad Sci* 1994; 730:42-52, 1994.
59. Sieling PA, *et al.* Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *J Immunol* 1993; 150(12):5501-10.
60. Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokines production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170: 2081-95.
61. Mosmann TR. Regulation of immune responses by T cells with different cytokine secretion phenotypes: role of a new cytokine, Cytokine Synthesis Inhibitory Factor (IL-10). *Int Arch Allergy and Applied Immunol* 1991; 94(1-4):110-5.
62. Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. *J Biol Chem* 1992; 267(32):23301-8.
63. Bogdan C, Nathan C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor- β , interleukin-4, and interleukin-10. *Ann NY Acad Sci* 1993; 685:713-39.

64. Weiss E, *et al.* The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *J Am Acad Dermatol* 2004; 50:657-75.

65. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol Baltimore* 1991; 147(11):3815-22.

66. Gazzinelli RT, Oswald IP, James SL, Scher A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- γ -activated macrophages. *J Immunol* 1992; 148(6):1792-6.

67. Taga K, Tosato G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-12 production. *J Immunol* 1992; 148(4):1143-8.

68. Fukutomi Y, Matsuoka M, Minagawa F, Toratani S, McCormick G, Krahenbuhl J. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of mycobacterium leprae. *Int J Lepr* 2004; 72(1):16-26.

69. Del Prete G, De Carli M, Almerigogna F, Giudizi MG, Biagiotti R, Romagnani S. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. *J Immunol* 1993; 150(2):353-60.

70. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Imunologia* 5^a ed. São Paulo: Manole, 1999, p.139-53.

71. Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DNJ. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase

- and transforming growth factor-beta (TFG- β) in leprosy lesions. Clin Exp Immunol 1998; 113:438-42.
72. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med 1993; 329(27):2002-12.
73. Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. Br J Dermatol 2001; 145:809-15.
74. Ross R, *et al.* Involvement of NO in contact hypersensitivity. Int Immunol 1998; 10(1):61-9.
75. Oliveira SH, Fonseca SG, Romão PR, Figueiredo F, Ferreira SH, Cunha FQ. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. Parasite Immunol 1998; 20(9):405-12.
76. Takeichi O, Saito I, Okamoto Y, Tsurumachi T, Saito T. Cytokine regulation on the synthesis of nitric oxide in vivo by chronically infected human polymorphonuclear leucocytes. Immunology 1998; 93(2):275-80.
77. Taylor-Robinson AW, *of al.* Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. Eur J Immunol 1994; 24(4):980-4.
78. Fox SW, Chow JW. Nitric oxide synthase expression in bone cells. Bone 1998; 23(1):1-6.

79. Moncada S, Palmer RM, Higgs A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-42.
80. Liew FY. The role of nitric oxide in parasitic disease. *Ann Trop Med Parasitol* 1993; 87(6):634-42.
81. Goulart IMB, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor- β 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am J Pathol* 1996; 148:911-7.
82. Facchetti F, *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. *Am J Pathol* 1999; 154(1):145-52.
83. Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DNJ. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun* 2001; 69(5):3413- 7.
84. Sicher SC, Vazquez MA, Lu CY. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *J Immunol* 1994; 153(3):1293-300.
85. Faget GH, Pogge RC, Johansen FA, Dinan JF, Prejean BM, Eccles CG. The Promin treatment of leprosy: a progress report. *Pub Health Rep* 1943; 58:1729-41.
86. Organização Mundial De Saúde. Quimioterapia da hanseníase para programas de controle. (Série de Relatórios Técnicos, 675). Genebra: OMS; 1982.

87. Floch H. La sulfono-résistance du bacilli de Hansen. Arch L'Institut Pasteur 1957; 429:1-9.
88. Pettit JHS., Rees RJW. Sulphone resistance in leprosy: an experimental and clinical study. Lancet 1964; 2:673-4.
89. Opromolla DVA, Souza Lima L, Caprara G. Rifamycin SV in the treatment of lepromatous leprosy. Lepr Rev 1965; 36:123-31.
90. Trindade MAB. Evolução histológica de reativações da hanseníase durante ou após o tratamento [Tese de Doutorado]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina — UNIFESP; 1996.
91. Jacobson RR, Hastings RC. Rifampin-resistant leprosy [Letter]. Lancet 1976; 2:1304.
92. Jacobson RR. Treatment of leprosy. In: Hastings RC, editor. Leprosy 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.317-49.
93. Ministério da Saúde — Guia para o Controle da Hanseníase. Cadernos de Atenção Básica — número 10. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
94. Opromolla DVA, Fleury RN. Classification of leprosy. In: Latapi F, Saúl A, Rodriguez O, Browne SG. Leprosy. Proceedings of the XI International Leprosy Congress. Amsterdam: Excerpta Médica; 1978. p. 254-60.
95. Opromolla DVA. Alguns comentários acerca de um caso relatado por Wade e Rodriguez nos anos 30. Hansen Int 1995; 20:29-37.

96. Naafs B, Wheate HW. The time interval between the start of anti-leprosy treatment and the development of reactions in borderline patients. *Lepr Rev* 1978; 49:153-7.
97. Souza Campos N, Rath de Souza, P. Reactional states in leprosy. *Int J Lepr* 1954; 22:259-73.
98. Jopling WH. Leprosy reactions (reactional states). In: *Handbook of leprosy* 2nd ed. London: William Heinemann Med. Books; 1978. p.66-74.
99. Souza Lima L, Souza Campos N. *Lepra tuberculóide: estudo clínico-histopatológico*. São Paulo: Renascença; 1947.
100. Dharmendra. Classification of leprosy. In: Hastings RC, editor. *Leprosy* 2nd ed. New York: Churchill Livingstone; 1994. p.179-90.
101. Wade HW. Tuberculoid changes in leprosy: II Lepra reaction in tuberculoid leprosy. *Int J Lepr* 1934; 2:279-92.
102. Lastoria JC, Opromolla DVA, Fleury RN, Habermann F, Curi PR. Serial Mitsuda testes for identification of reactional borderline leprosy forms. *Int J Lepr* 1998; 66(2):190-200.
103. Shelly VP, Wakade A, Antia NH. High incidence of viable *Mycobacterium leprae* in post-MDT recurrent lesions in tuberculoid leprosy patients. *Lepr Rev* 2001; 72:337-44.
104. Desikan ITV. Relapse, reactivation or reinfection? [Symposium paper]. *Indian J Lepr* 1995; 67:3-11.

105. Job CK. Histopathological features of relapsed leprosy [Symposium paper]. *Indian J Lepr* 1995; 67:69-80.
106. Opromolla DVA. As reações tipo I [Editorial]. *Hansen Int* 2001; 26: 89-90.
107. Waters MFR. Distinguishing between relapse and late reversal reaction in multidrug (MDT)-treated BT leprosy [Editorial]. *Lepr Rev* 2001; 72:250-3.
108. Ridley DS, Radia KB. The histological course of reactions in borderline leprosy and their outcome. *Int J Lepr* 1981; 49:383-92.
109. Becx-Bleuminck M. Relapses among leprosy patients treated with multidrug therapy: experience in the leprosy control program of the all Africa leprosy and rehabilitation training center (ALERT) in Ethiopia; practical difficulties with diagnosing relapses; operational procedures and criteria for diagnosing relapses. *Int J Lepr* 1992; 60:421-35.
110. Yamamura M, *et al.* Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. *J Immunol* 1992; 149(4):1470-5.
111. Verhagen CE, *et al.* Reversal reaction in borderline leprosy is associated with a polarized shift to type 1-like *Mycobacterium leprae* T-cell reactivity in lesional skin. *J Immunol* 1997; 159:14705.
112. Atkinson SE, *et al.* Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (Ti R) reactions. *Int J Lepr* 2004; 72(1):27-34.

113. Converse PJ., Bjune G. Natural killer (NK) cell activity and reversal reaction in leprosy. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 1986; 54(4):503-9.
114. Rijk AJ, Gabre S, Byass P, Berhanu T. Field evaluation of WHO-MDT of fixed duration, at ALERT, Ethiopia: the AMFES project: II. Reaction and neuritis during and after MDT in PB and MB leprosy patients. *Lepr Rev* 1994; 65:320-32.
115. Lockwood DNJ, Vinayakumar S, Stanley JNA, McAdam KPWJ, Colston MJ. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad, India. *Int J Lepr* 1993; 61:8-15.
116. Roche PW, Theuvenet WJ, Britton WJ. Risk factors for type 1 reactions in borderline leprosy patients. *Lancet* 1991; 338:654-57.
117. Godal T, Myrvang B, Samuel DR, Ross WF, Lofgren M. Mechanism of "reactions" in borderline tuberculoid (BT) leprosy. *Acta Path Microbiol Scand* 1973; 236 Suppl A:45-53.
118. Bjune G, Barnetson RStC, Ridley DS, Kronvall G. Lymphocyte transformation test in leprosy: correlation of response with inflammation of lesions. *Clin Exp Immunol* 1976; 25:85-94.
119. Opromolla DVA, Fleury RN. Classification of leprosy. In: Latapi F, Saúl A, Rodriguez O, Browne SG. *Leprosy. Proceedings of the XI International Leprosy Congress*. Amsterdam: Excerpta Médica; 1978. p. 254-60.
120. Starlz TE, Zinkernagel RM. Antigen localization and migration in immunity and tolerance. *N Engl J Med* 1998; 339(26):1905-13.

121. Belone AFF. Hanseníase na faixa tuberculóide: estudo comparativo entre manifestações tórpidas e reacionais através de avaliações de antígenos micobacterianos e de parâmetros representativos de hipersensibilidade mediada por células, em biópsias cutâneas. [Tese de Doutorado]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista — UNESP; 2004.

Anexos

8. ANEXOS

Anexo 1 – Análise quantitativa de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Número total de linfócitos T/mm² distribuídos na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total, e proporção CD4:CD8 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase hanseníase-dimorfa tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR).

Biópsia	CD4		CD4		CD4		CD8		CD8		CD4:CD8	
	DS	DM	DP	TOTAL	DS	DM	DP	TOTAL	DS	DM	DP	TOTAL
B02-0861	405	420	395	1220	293	215	233	742				1,64
B02-1338	388	423	510	1322	383	368	443	1195				1,11
B02-2354	657	465	365	1487	368	317	285	970				1,53
B02-2441	487	437	490	1413	357	320	255	932				1,52
S03-0440	577	542	800	1918	278	405	375	1058				1,81
B03-0544	313	192	168	672	283	187	175	645				1,04
B03-0561	392	500	467	1358	328	333	490	1152				1,18
B03-0578	405	525	595	1525	395	502	532	1428				1,07
B03-3471	278	168	250	697	472	223	343	1038				0,67
B04-0347	423	342	522	1287	297	247	415	958				1,34

Anexo 2 – Análise quantitativa de linfócitos T (CD4+ e CD8+). Número total de linfócitos T/mm2 distribuídos na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total, e proporção CD4:CD8 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase hanseníase-dimorfa em reação reversa (D-RR).

Biópsia	CD4		CD4		CD4		CD8		CD8		CD4:CD8
	DS	DM	DP	TOTAL	DS	DM	DP	TOTAL			
B00-2524	370	480	238	1088	287	423	185	895	1,22		
B04-2826	403	487	353	1243	328	288	193	809	1,54		
B01-3223	280	370	432	1082	222	292	375	889	1,22		
B01-1189	292	342	445	1079	150	225	300	675	1,60		
B00-1966	380	403	372	1155	305	248	287	840	1,38		
B02-2415	320	213	347	880	192	163	245	600	1,47		
B01-0580	455	510	478	1443	282	373	363	1018	1,42		
B00-4127	395	402	335	1132	418	282	223	923	1,23		
B02-1022	330	272	292	894	240	212	203	655	1,36		
B03-4012	355	362	337	1054	185	222	215	622	1,69		

Anexo 3 — Análise semiquantitativa de linfócitos B (CD20+ e CD79+). Distribuição dos linfócitos CD20+ e CD79+ na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-4+).

Biópsia	CD20	CD20	CD20	CD20	CD79	CD79	CD79	CD79
	DS	DM	DP	TOTAL	DS	DM	DP	TOTAL
B02-0861	2	3	4	3	2	3	4	3
B02-1338	3	3	3	3	2	3	3	3
B02-2354	3	3	4	3	3	3	4	3
B02-2441	2	3	3	3	2	3	3	3
S03-0440	2	3	3	3	2	3	3	3
B03-544	2	2	3	2	1	1	2	1
B03-0561	2	3	3	3	1	2	2	2
B03-0578	2	3	3	3	1	2	2	2
B03-3471	1	1	3	2	1	1	3	2
B04-0347	1	2	3	2	1	2	2	2

Anexo 4 – Análise semiquantitativa de linfócitos B (CD20+ e CD79+). Distribuição dos Linfócitos CD20+ e CD79+ na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total em lesões cutâneas de pacientes em hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores expressos em +(Escala de 0-4+)

Biópsia	CD20	CD20	CD20	CD20	CD79	CD79	CD79	CD79
	DS	DM	DP	TOTAL	DS	DM	DP	TOTAL
B00-2524	3	3	2	3	3	3	2	3
B04-2826	2	2	2	2	2	2	2	2
B01-3223	2	2	2	2	2	2	2	2
B01-1189	2	2	2	2	2	2	2	2
B00-1966	2	2	3	2	2	2	2	2
B02-2415	2	3	3	3	2	3	3	3
B01-0580	2	2	2	2	2	2	2	2
B00-4127	2	3	3	3	2	3	3	3
B02-1022	2	3	3	3	2	3	3	3
B03-4012	2	3	2	2	2	3	2	2

Anexo 5 - Análise quantitativa de células NK (CD57+). Número total de células NK/mm² distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR).

Biópsia	NK DS	NK DM	NK DP	NK TOTAL
B02-0861	7	11	6	24
B02-1338	20	25	28	73
B02-2354	20	37	22	79
B02-2441	39	18	29	86
S03-0440	47	41	34	122
B03-0544	37	34	24	95
B03-0561	99	77	138	314
B03-0578	38	52	57	147
B03-3471	9	6	5	20
B04-0347	155	112	110	377

Anexo 6 — Análise quantitativa de células NK (CD57+). Número total de células NK/mm² distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR).

Biópsia	NK DS	NK DM	NK DP	NK TOTAL
B00-2524	515	525	213	1253
B04-2826	25	10	18	53
B01-3223	60	60	125	245
B01-1189	75	120	100	295
B00-1966	100	155	85	340
B02-2415	21	15	17	53
B01-0580	35	80	55	170
B00-4127	110	105	105	320
B02-1022	45	45	55	145
B03-4012	55	30	31	116

Anexo 7 — Análise quantitativa de células expressando IL-10. Número total de células IL10+/mm² distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR).

Biópsia	IL-10 DS	IL-10 DM	IL-10 DP	IL-10 TOTAL
B02-0861	49	42	16	107
B02-1338	7	9	7	23
B02-2354	52	26	41	119
B02-2441	30	34	17	81
S03-0440	5	5	5	15
B03-0544	26	11	5	42
B03-0561	2	7	7	16
B03-0578	63	75	30	168
B03-3471	19	13	16	48
B04-0347	31	10	05	46

Anexo 8 — Análise quantitativa de células expressando IL-10. Número total de células IL10+/mm2 distribuídas na derme superficial (DS), média (DM), profunda (DP) e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR).

Biópsia	IL-10 DS	IL-10 DM	IL-10 DP	IL-10 TOTAL
B00-2524	22	28	19	69
B04-2826	34	15	12	61
B01-3223	50	38	18	106
B01-1189	17	10	6	33
B00-1966	30	24	5	59
B02-2415	20	16	7	43
B01-0580	20	24	3	47
B00-4127	43	23	15	81
B02-1022	42	28	16	86
B03-4012	-	-	-	-

Anexo 9 — Análise semiquantitativa de células expressando INOS. Imunomarcção positiva de células inflamatórias nas biópsias de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide reacional antes do tratamento (DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+)

Biópsia	INOS DS	INOS DM	INOS DP	INOS TOTAL
B02-0861	2	1	1	1
B02-1338	2	2	2	2
B02-2354	1	1	1	1
B02-2441	1	1	1	1
S03-0440	3	3	3	3
B03-0544	2	2	2	2
B03-0561	1	1	1	1
B03-0578	2	2	2	2
B03-3471	-	-	-	-
B04-0347	-	-	-	-

Anexo -10 Análise semiquantitativa de células expressando iNOS. Imunomarcção positiva de células inflamatórias nas biópsias de lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa em reação reversa (D-RR). Valores expressos em + (Escala de 0-3+)

Biópsia	INOS DS	INOS DM	INOS DP	INOS TOTAL
B00-2524	3	3	3	3
B04-2826	3	3	3	3
B01-3223	2	2	1	2
B01-1189	2	2	2	2
B00-1966	2	2	1	2
B02-2415	3	2	2	2
B01-0580	2	2	1	2
B00-4127	3	2	2	2
B02-1022	2	2	2	2
B03-4012	3	3	2	3