
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 imunocelular 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 tardia ⁵⁴.

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 humoral ⁵⁹. 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 CDB⁺ 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 diidrofólico⁸⁶.

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 dapsona⁸⁹, 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 milhão⁹⁰. Porém, quando utilizada isoladamente, também há possibilidade de resistência bacteriana⁹¹, 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 hansênicas⁹².

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 ano⁹³.

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.

Introdução e Revisão Bibliográfica

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 virchovianos⁹⁹. Eram, pois, instáveis, e na classificação de Madrid (1953) foram incluídos no grupo dimorfo¹⁰⁰. 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 imunecelular 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 imunistoquímica. Por meio destas últimas, avaliando a população celular, a atividade macrofágica, a presença de antígenos micobacterianos nos tecidos e a atividade moduladora / supressora da citocina IL-10.