

**Andréa de Faria Fernandes Belone**

**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 apresentada à Faculdade de  
Medicina de Botucatu da Universidade  
Estadual Paulista – UNESP, para  
obtenção do título de Doutor em  
Patologia

Orientadora: Dra. Mariângela Ester Alencar Marques

Botucatu – SP

2004

**Andréa de Faria Fernandes Belone**

**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 apresentada à Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista — UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

Orientadora: Dra. Mariângela Ester Alencar Marques

Botucatu — SP  
2004

*"Tudo concorre para o bem daqueles que amam a Deus "*  
*(Romanos, 8-28)*

*"O significado e a alegria em minha  
ciência vem naqueles raros momentos  
em que descobro algo novo e digo a  
mim mesmo: Pois é assim que Deus o  
fez!. Meu alvo é compreender um  
pequeno ângulo do plano de Deus."*

*Henry Schaefer*

*Aos meus pais Antônio (in memoriam)  
e Maria Helena, peço amor incondicional,  
exemplo de honestidade, de luta e caráter, que  
fizeram de mim o que sou.*

*Ao meu esposo Ayres, companheiro de todos os  
meus sonhos, por seu amor, cumplicidade e apoio  
constante em mais esta jornada.*

*As minhas queridas filhas Giovanna e Beatriz,  
presentes de Deus e sentido de minha vida, pela ausência  
Indesejada, mas necessária neste momento.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À Prof. Dra.. Mariângela Ester Alencar Marques, por aceitar ser minha orientadora, mesmo sem me conhecer, pela confiança e liberdade de trabalho que me deu, e pela seriedade, determinação científica e humana, minha admiração e gratidão.*

*Ao Prof. Dr. Raul Negrão Fleury, exemplo de profissionalismo e amor à patologia, o mestre que, sem perceber, teve enorme responsabilidade em minha formação científica, agradeço a confiança e a oportunidade de partilhar este trabalho, fortalecendo meu conceito, de que tudo posso, na graça daquele que me fortalece.*

*Ao Prof Dr. Diltor Vladimir Araújo Opromolla, pelo exemplo de dedicação e amor à ciência, pela imensa contribuição na minha formação científica, mas principalmente porque acreditou em minha potencialidade e ajudou-me a descobrir o verdadeiro sentido da pesquisa.*

## AGRADECIMENTOS

*A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente com o desenvolvimento e finalização deste trabalho, com minha formação profissional e crescimento pessoal meus sinceros agradecimentos:*

*Ao Dr. Marcos da Cunha Lopes Virmond, Diretor Técnico de Departamento do Instituto Lauro de Souza Lima, pela atenção e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho*

*Ao Dr. Cleverson Soares Teixeira, amigo e incentivador constante, pelas várias horas de análise quantitativa no microscópio e pela confecção de todo material fotográfico e didático deste trabalho.*

*À Pesquisadora Dra. ,Fátima Regina Vilani-Moreno, da Equipe Técnica de Imunologia do Instituto Lauro de Souza Lima, pela grande ajuda durante todas as fases deste projeto e pela amizade e apoio constante.*

*Ao Dr. Jaison Antônio Barreto, amigo e companheiro de inúmeras discussões científicas, fundamentais para minha formação e crescimento, por dividir comigo sua experiência e ajudar a superar minhas limitações.*

*À Pesquisadora Dra. Patrícia Sammarco lisa, minha amiga e irmã, pelo empenho na realização da versão para a língua inglesa do resumo deste trabalho, mesmo d distância, mas principalmente pela amizade e cumplicidade incondicional*

## AGRADECIMENTOS

---

*Ao Dr. Cássio Ghidella, do Pólo de Dermatologia de Rondonópolis, MS, pela seleção clínica de muitos pacientes deste trabalho.*

*Ao Prof. Dr. José Eduardo Corrente, do Departamento de Bioestatística do Instituto de Biociências de Botucatu, pela disponibilidade constante em me atender e pela análise estatística deste trabalho.*

*A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Maria Rita Parise Fortes, do Departamento de Patologia e Imunologia do Instituto de Biociências de Botucatu, pela doação do anticorpo anti-IL-10 utilizado neste trabalho.*

*Ao Marcos Roberto Franchi, funcionário do departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu, pela disponibilidade no auxílio na execução da imunistoquímica para a citocina IL-10.*

*Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, em especial et Regina Célia Spadim pela atenção e amabilidade.*

*À bibliotecária Sulamita Selama Clemente Colnago da UNESP (Botucatu), pela elaboração da ficha catalográfica.*

*Aos funcionários e amigos da Equipe Técnica de Patologia, do Instituto Lauro de Souza Lima, em especial a Débora Regina Fernandes, Fabiana Aparecida Camargo, Nelci Ana Vieira, Maria Luiza Bertonha, Maria Melena Ernesto, Gláucia Sfelsoisa Souza, Osmar de Abreu, Francisco, Eduardo Relá, Ana Lúcia de Oliveira e Adriana Macedo da Cruz, pelo auxílio, tanto nos cortes,*

## AGRADECIMENTOS

---

*colorações e na técnica imunoistoquímica, como na configuração gráfica deste estudo, minha eterna gratidão.*

*As amigas Maria Teresa C. B. R. Nakandakari, Ida Maria Baptista, Esther Esther Nogueira, Eliane Silva, Elaine Camarinha Marcos, Suzana Madeira, Lúcia Melena Marciano, Rpssemari Baccarelti, Ana Carolina Weckjverth, Heloisa Cristina Guimarães e Erika Mozer, pela amizade, colaboração e apoio em todos os momentos.*

*Á Paula Opromolla, do Núcleo de Apoio d Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo auxílio na análise estatística e pelo empenho na execução gráfica deste trabalho.*

*Á Telma Aparecida Amaral Sneideris e Luiz Carlos Duarte, do Centro de Processamento de Dados do Instituto Lauro de Souza Lima, pela valiosa contribuição na impressão gráfica desta tese.*

*Á Célia Maria Rala, Cleide Ortega, Juliana Poloni e José Ricardo, Franchim, do Setor de Treinamento e Ensino do Instituto Lauro de Souza Lima, pela atenção e carinho que sempre me dispensaram.*

*Aos funcionários da Biblioteca do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo carinho, atenção e eficiência que sempre me atenderam.*

*Aos colegas do Instituto Lauro de Souza Lima, pelo carinho e incentivo constante para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.*

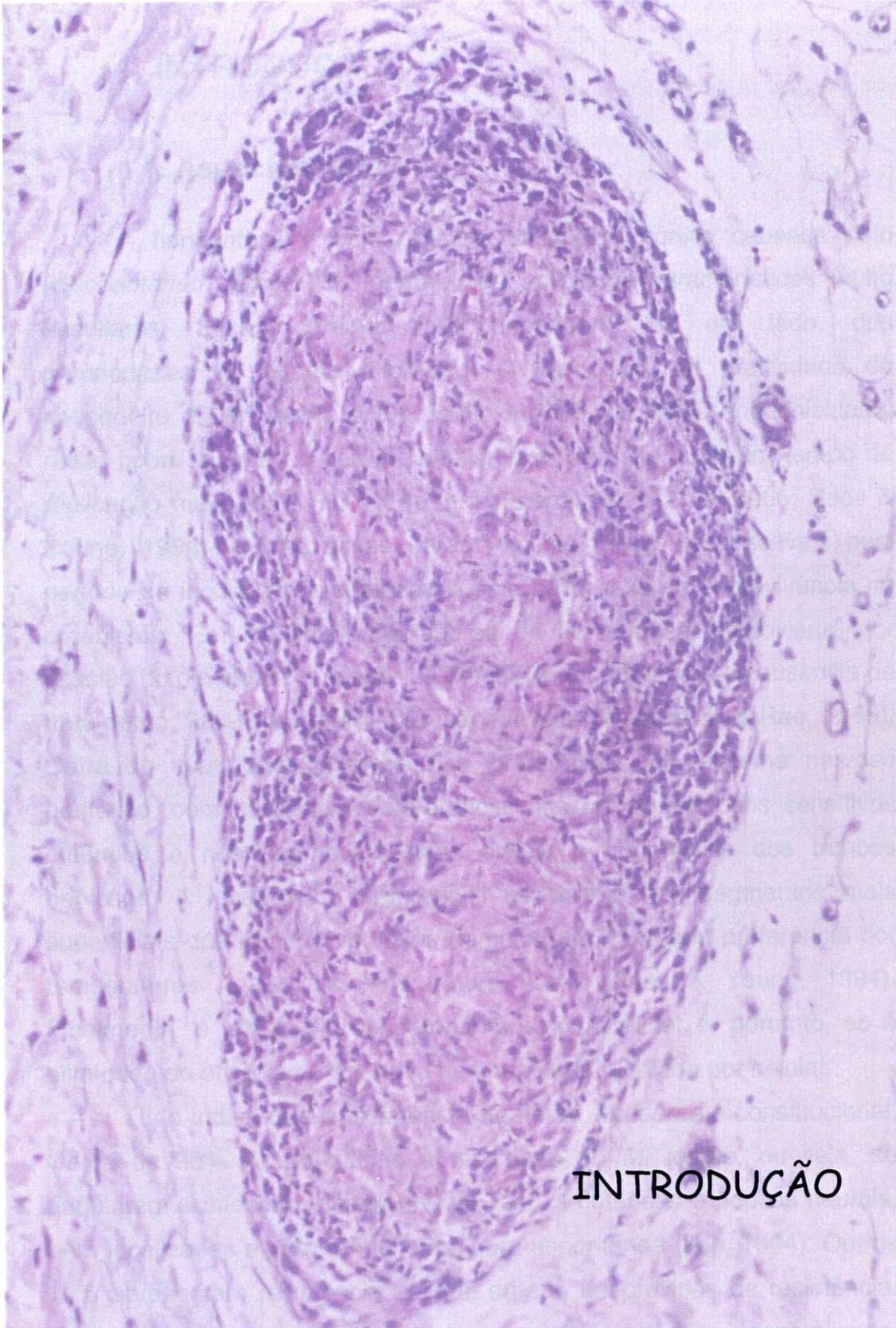
## AGRADECIMENTOS

---

*A todos os meus irmãos de fé, que por meio de muitas orações intercederam para que eu vencesse mais esta etapa da minha vida, minha gratidão.*

# Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. Aspectos gerais.....	12
1.2. Antígenos micobacterianos.....	14
1.3. Imunidade inata.....	16
1.4. Imunidade adaptativa.....	18
1.5. Padrão de citocinas.....	20
1.6. O papel da IL-10.....	21
1.7. A função do óxido nítrico sintase indizível (iNOS).....	22
1.8. Reação tipo 1.....	25
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3. MANUSCRITO.....</b>	<b>31</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
<b>5. ANEXOS.....</b>	<b>69</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>



INTRODUÇÃO

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Aspectos gerais

A hanseníase é uma doença infecciosa crônica causada pelo *Micobacterium leprae* (*M. leprae*), que apresenta características muito peculiares. Essas características dependem, de um lado, das propriedades do agente etiológico, e, de outro, 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) (Shepard & McRae, 1965; Rees & Young, 1994). Talvez essas características sejam responsáveis pelo período de incubação prolongado e pela baixa taxa de sobrevivência no organismo. Em indivíduos portadores de hanseníase virchoviana, por ocasião do diagnóstico, apesar da defesa imune mínima e na ausência de tratamento, 90% dos bacilos não são viáveis (Shepard & McRae, 1965). Outra de suas características é a preferência pelo sistema nervoso periférico, com parasitismo preferencial nos ramos nervosos sensitivos cutâneos e nos segmentos mais distais e superficiais dos troncos nervosos. A localização preferencial na pele e nos segmentos mais superficiais dos troncos nervosos demonstram, também, preferência por temperaturas abaixo da temperatura basal (Rees & Young, 1994). Finalmente, é um bacilo obrigatoriamente intracelular e, portanto, só é eliminado do organismo por meio da imunidade mediada por células.

Tudo indica que a resistência frente ao *M. leprae* é constitucional. Cerca de 90% da população é resistente ao *M. leprae*, ou seja, se adquirirem a infecção, desenvolverão lesões cutâneas e poucas neurais, bem localizadas e com tendência a cura espontânea (Job, 1994). Outros 10% apresentam resistência parcial, ou são desprovidos de resistência. Estes últimos, se infectados, desenvolverão doença generalizada, comprometendo pele, nervos, mucosas e vísceras. O teste de Mitsuda

(injeção intradérmica de 0,1 ml de uma suspensão de bacilos mortos obtidos através de biópsia de nódulos de pacientes multibacilares, com leitura após 28 dias) é 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 de 5 mm ou ausente) nos indivíduos desprovidos de resistência ou com resistência apenas parcial (Harboe, 1994; Job, 1994).

Os indivíduos que desenvolvem a Hanseníase de máxima resistência (Tuberculóides polares) mostram quadro estrutural representado pelo granuloma de células epitelioides bem diferenciadas, contornado por halo de células mononucleares, principalmente linfócitos, mas incluindo macrófagos não diferenciados, monócitos; os bacilos são raríssimos ou ausentes. (Ridley, 1987; Job, 1994). Já naqueles que desenvolvem a hanseníase de mínima resistência (Virchovianos), mostram, na histopatologia, extensos granulomas de células macrofágicas volumosas, não epitelioides, abarrotadas de bacilos. Os linfócitos são escassos e esparsos no interior dos granulomas (Ridley, 1987; Job, 1994).

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 (Rabello, 1978). Entre esses dois pólos há manifestações intermediárias próprias de indivíduos com resistência parcial, caracterizando o grupo dimorfo. Dentro deste grupo, há um subgrupo com características muito próximas ao pólo tuberculáide, quanto à morfologia das lesões e à estrutura granulomatosa, porém com lesões múltiplas, freqüentemente generalizadas e apresentando baciloscopia positiva (Fleury, 1989). Outro grupo tem características próximas as 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 (dimorfo-virchovianos) (Fleury, 1989). Um subgrupo absolutamente intermediário (dimorfo-dimorfo) mostra granulomas frouxos, com células epiteliáides pouco diferenciadas, escassos linfócitos e rica baciloscopia. O grupo dimorfo não é estável quanto a localização no espectro. Deixados sem tratamento, esses pacientes pioram, adquirindo progressivamente características semelhantes às descritas para o pólo virchoviano (Ridley & Jopling, 1962,1966; Ridley, 1987).

A base da resistência imune na hanseníase, de maneira simplista, é a 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 substâncias as quais, agindo sobre os macrófagos, estimulam a fagocitose e o processamento dos antígenos micobacterianos, transformando-se em células epiteliáides e formando granulomas tuberculóides (Harboe,1994). A deficiência total ou parcial desse mecanismo imune resulta nas alterações histopatológicas, baciloscópicas, clínicas e evolutivas próprias dos virchovianos e dos dimorfos (Krahenbuhl, 1994).

## **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 (Kirchheimer & Storrs, 1971; Meyers et al., 1994).

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 (Hunter & Brennan, 1981; Hunter et al, 1982; Neil & Klebanoff, 1988; Vachula et al, 1989). O PGL-1 também causa uma inibição específica da liberação de citocinas por monócitos de indivíduos saudáveis após estimulação por lipopolissacarídeos "in vitro" (Silva et al, 1993), e é capaz de induzir supressão de resposta mitogênica de linfócitos "in vitro" de pacientes com hanseníase (Mehra et al, 1984; Prasad et al, 1987).

A lipoarabinomanana (LAM) é um componente da parede celular de várias micobactérias, que podem excretá-lo em grande quantidade, e está relacionada à patogênese e sobrevivência do bacilo dentro dos macrófagos (Rees & Young, 1994). Nesse sentido, bloqueia a capacidade dos macrófagos de responder aos efeitos ativadores do interferon gama (IFN- $\gamma$ ), bloqueia a indução e a liberação do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e inibe a apresentação antigênica pelas CAA (Roitt et al., 1999a; Lockwood et al., 2002).

Estudos imunistoquímicos com anticorpo anti-PGL-1 demonstram que este marcador apresenta bons resultados em pacientes multibacilares. Porém, apesar de específico, alguns autores referem que este anticorpo não se mostrou eficaz na detecção de antígenos micobacterianos em casos paucibacilares (Van Den Bos et al., 1999; Verhagen et al., 1999), ao contrário dos resultados de Narayanan et al. (1990) e Wang et al. (1992).

O anticorpo anti-LAM parece ter mais sensibilidade, apesar de haver descrição de reatividade cruzada com antígenos de nervos (Shelly et al., 1994; Van Den Bos et al., 1999). Em pacientes BT com reação reversa, foi detectada positividade para LAM dentro do granuloma e em macrófagos, mesmo quando a coloração de Fite-Faraco foi negativa (Lockwood et al., 2002). 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 imunomarcação para PGL-1 dentro do granuloma tornou-se negativa antes que o LAM.

Ainda em relação à detecção de antígenos em biópsias, observa-se que em casos de hanseníase paucibacilar, ou seja, tuberculose e indeterminada, a baciloscopia da biópsia é, na maioria das vezes, negativa (Natrajan et al, 1999). Nestes casos, pode-se aumentar a detecção de antígenos bacilares por meio da utilização do anticorpo policlonal anti-BCG (Takashashi et al., 1991; Barbosa et al., 1994; Schettini et al, 2001; Fakhouri et al., 2003), que reage cruzadamente com o *M. leprae* (Pagliari et al, 1995), porém tem a desvantagem de poder marcar, também, várias outras bactérias e muitas espécies de fungos (Kutzner et al, 1998; Schettini et al, 2001).

### **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 90% das pessoas que são expostas ao bacilo tornam-se Mitsuda positivos, porém apenas uma minoria dos indivíduos infectados desenvolve a doença (Job, 1994). Isso se deve, provavelmente, à predisposição genética e ao impedimento da infecção pela imunidade inata, que é formada pelas barreiras naturais, representada pela integridade dos epitélios, secreções e IgA de superfície, dispersão dos microorganismos no sistema linfático, sistema mononuclear fagocítico (Mims, 1982) e por células com capacidade microbicida independente da ativação da imunidade adaptativa, ou seja, células exterminadoras, linfócitos T  $\gamma\delta$  e macrófagos ativados (Modlin, 2002; Roitt, 1999b). Uma vez o organismo exposto ao bacilo, uma primeira etapa no desenvolvimento da infecção seria a passagem pelas

barreiras naturais. Se o bacilo ultrapassar essas defesas, encontrará os linfócitos T  $\gamma\delta$ , 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  $\gamma\delta$  circulantes são geralmente CD4<sup>-</sup> e CD8<sup>-</sup> (duplo negativos), mas a maioria geralmente apresenta receptores CD8<sup>+</sup> nos tecidos (Roitt et al., 1999b) e, portanto, têm ação citotóxica. Podem reconhecer superantígenos e antígenos de micobactérias (Kuby, 2002), responder a antígenos protéicos presentes em muitos patógenos, denominados proteínas do choque térmico (hsp) (Kaufmann, 1994; Modlin & Rea, 1994), e mesmo reconhecer antígenos apresentados por receptores CD1, como o LAM. Além disso, podem produzir citocinas próprias da resposta Th1 e ativar macrófagos teciduais sem a necessidade prévia de imunidade adaptativa (Modlin, 2002).

Da mesma forma, as células NK, além de produzirem granzima, perforina, e granulísina, esta última com capacidade destrutiva direta para micobactérias (Ernst et al., 2000; Modlin, 2002), também podem secretar IFN $\gamma$  sob ação da IL-12 secretada por macrófagos infectados, estimulando a destruição intrafagolisossomal (Modlin, 1994; Garcia et al., 1999). Estas células são linfócitos morfolologicamente grandes e granulares e 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 $\gamma$ , quando estimuladas por IL-2 (Roitt, 1999b). São detectadas principalmente pela expressão de CD16, CD56 e CD57 (Roitt, 1999b). Existem evidências de que a função citotóxica pode não ser a mais importante função dessa população celular. Esses linfócitos são capazes de produzir IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , fator estimulante do crescimento de colônias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e interleucina 3 (IL-3) (Trinchieri et al., 1984; Cuturi et al., 1989). Podem ter um papel precoce importante nas infecções intracelulares, pois estímulos inespecíficos podem induzir a produção de citocinas, sendo a produção de IFN $\gamma$  mais rápida e intensa do que pelos

linfócitos T (Trinchieri et al., 1984; Garcia et al, 1999), com os quais atuam sinergicamente na modulação da resposta imune celular (Chan et al., 1991).

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

#### **1.4. Imunidade adaptativa**

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 intracelulares (Modlin, 1994).

Nos indivíduos sem imunidade celular, ou seja, os virchovianos (VV), os bacilos serão fagocitados e multiplicar-se-ão livremente, atraindo novos macrófagos para o local, desenvolvendo um granuloma macrófagico não diferenciado. Nesta forma, a lesão histopatológica mostra extenso infiltrado macrófagico, onde os macrófagos são volumosos, abarrotados de bacilos, com citoplasma homogêneo, levemente vacuolar ou multivacuolar (célula de Virchow) (Ridley, 1987; Job, 1994). Os linfócitos são escassos, focais, com predomínio de células CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (supressoras) e estão distribuídos entre os macrófagos (Modlin & Rea, 1994).

Desde 1983, vários autores (Modlin et al, 1983; Narayanan et al, 1983; Kato et al, 1983) vêm postulando que, nos pacientes com imunidade celular plena, os tuberculoses (TT), o granuloma é formado por agregados de macrófagos com diferenciação epitelial bem evidente, células gigantes multinucleadas tipo Langhans, linfócitos CD4<sup>+</sup> justapostos aos macrófagos no centro da lesão, e com muitas células CD8<sup>+</sup> 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). 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 (CD45R0+). Já nas lesões LL, a metade das células CD4+ pertence a subclasse de células T-naive (Modlin & Rea, 1994). 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 (de la Barrera et al, 2004).

### 1.5. Padrão de citocinas

O entendimento da regulação da resposta imune as infecções resultou de análise do padrão de citocinas produzido por clones de linfócitos T CD4<sup>+</sup> murinos. Nesses modelos, na infecção intracelular, a resposta imune resistente *versus* suscetível parece ser regulada por duas subpopulações de linfócitos T, gerando as respostas tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) (Mosmann et al, 1986). Da mesma forma, na hanseníase, a resposta imune resistente *versus* suscetível parece ser regulada por duas subpopulações de linfócitos T, gerando as respostas tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2) (Yamamura et al, 1991; Sieling & Modlin, 1992, 1994). As subpopulações de linfócitos T, que produzem IL-2 e IFN $\gamma$ , chamadas Th1, aumentam a imunidade mediada por células. O IFN $\gamma$  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 (5 a resposta humoral (Sieling et al, 1993). Tanto a IL-4 quanto a IL-10 estimulam células B, que inibem a ativação de macrófago, resultando em infecção progressiva (Sieling & Modlin, 1994; Modlin, 2002).

Estudos imunistoquímicos, por hibridização *in situ*, e ampliações de mRNA nas lesões de hanseníase têm demonstrado que, na forma TT, há predomínio de citocinas Th1 (IL-2, IFN $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), caracterizando resposta imune celular eficiente e resistência a proliferação do *M. leprae*, com tendência à cura espontânea. Na forma VV, 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 (Yamamura et al, 1991; Kaufmann, 1994).

## 1.6. O papel da IL-10

A Interleucina 10, ou fator inibidor da síntese de citocinas, foi descrita inicialmente como o fator produzido por linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th2 capaz de suprimir a produção de citocinas por linfócitos T CD4<sup>+</sup> Th1 (Bogdan & Natan, 1993). 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 (Fiorentino et al., 1989; Mosmann, 1991; Bogdan et al, 1992; Weiss et al, 2004). A produção desta citocina por estas células está aumentada na presença de endotoxinas, TNF $\alpha$ , catecolaminas e de drogas que elevam os níveis de adenosina monofosfato (AMP) cíclico (Weiss et al, 2004).

A IL-10 inibe a produção de IFN $\gamma$  por linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> 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) (Fiorentino et al., 1991; Bogdan, 1992). Além disso, suprime a produção de citocinas pelos macrófagos ativados (TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-12) e a capacidade microbicida dessas células por inibição da expressão do receptor co-estimulador CD23, indispensável na formação de radicais intermediários de oxigênio (R01) e de nitrogênio (RNI) (Bogdan, 1992; Gazzinelli et al., 1992; Weiss,2004). Bloqueia a proliferação linfocitária, tanto de linfócitos Th1 como Th2, e a produção de IL-2 e de IFN $\gamma$  (Taga & Tosato, 1992), em resposta a antígenos e a mitógenos, mas não inibe a proliferação induzida pela IL-2. Também diminui a produção de IFN $\gamma$  pelos linfócitos Th1 (Fukutomi et al, 2004) e de IL-4 pelos Th2 (Del Prete et al, 1993; Weiss et al., 2004).

A IL-10 pode ser produzida tanto pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> quanto por linfócitos B ativados da resposta Th2, levando à estimulação da

apresentação de antígenos por linfócitos B. Estas podem ser as principais células apresentadoras de antígeno nos casos onde haja pouco antígeno local (Roitt et al., 1999c), inibindo a apresentação antigênica por células profissionalmente apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos (Weiss et al, 2004). Também pode ser produzida por linfócitos T CD4<sup>+</sup> da resposta Th3, ou reguladora, presente em qualquer tipo de resposta adaptativa (Weiss et al 2004). A IL-10 e o IFN $\gamma$  são citocinas antagônicas não só na função, como também na produção, uma vez que o IFN $\gamma$  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-2 (Weiss et al, 2004).

Na hanseníase, foi descrito que a IL-10 é expressa em altos níveis (mRNA) nas lesões do pólo VV, quando comparados às lesões do pólo TT (Sieling & Modlin, 1994), porém clones de linfócitos T das lesões de pele dos pacientes VV produzem apenas pequena quantidade dessa interleucina (Modlin, 1994). Anticorpos monoclonais anti-IL-10 aumentaram significativamente a proliferação de clones de linfócitos T específicos para o *M. leprae* e a liberação de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ . 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 (Modlin, 1994).

### **1.7. A função do óxido nítrico sintase induzível (iNOS)**

Uma efetiva resposta mediada por células T, e conseqüente eliminação do *M. leprae*, dependem do macrófago e de sua adequada ativação (Khanolkar et al., 1998). O NO é um gas, produto do metabolismo da L-arginina sob a ação das isoenzimas, denominadas NO sintases (NOS). As NOS existem três isoformas, denominadas NOs

endotelial (eNOS), NOs neural (nNOS) e NOS induzível (iNOS) (Moncada & Higgs, 1993). A síntese de NO tem sido observada em macrófagos e células gigantes multinucleadas, bem como em outras células, como fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais (Schon et al, 2001), células de Langerhans (Ross et al, 1998), eosinófilos (Oliveira et al, 1998), neutrófilos (Batista et al, 2002), linfócitos T helper (Taylor-Robinson et al, 1994), osteoclastos e osteoblastos (Fox & Chow, 1998), podendo ter vários efeitos dependendo do tipo de célula que a produz, do sítio de liberação e da concentração produzida (Moncada et al, 1991, 1992). O NO é uma toxina O<sub>2</sub> 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 tem sido considerado um tóxico mais potente (Roitt et al., 1999a; Schon et al, 2001).

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- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , IFN- $\gamma$ . Em contrapartida, as citocinas IL-10, IL-4 e o fator transformador do crescimento 6 (TGF- $\beta$ ) inibem a expressão de iNOS e conseqüente produção de NO por macrófagos *in vitro* (Liew et al, 1993; Moncada et al, 1992; Goulart, 1996).

Tem sido evidenciada intensa expressão de iNOS em células epitelióides e células gigantes multinucleadas de granulomas causados por *M. leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Cryptococcus neoformans* e *Leishmania sp* (Khanolkar, et al., 1998; Facchetti et al, 1999; Schon, 2001; Little, et al., 2001).

O NO apresenta importante papel imunorregulador, sendo produzido e atuando sobre as principais células do sistema imune, como macrófagos e linfócitos T (Taylor-Robinson et al, 1994). A produção de NO por linfócitos T CD4<sup>+</sup> 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- $\gamma$  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 **feed-back** negativo inibindo a produção de IL-2 e IFN- $\gamma$ , prevenindo, assim, a proliferação de células Th1, de células CD8+ e de macrófagos; adicionalmente, as células Th2 proliferaram na presença de IL-4, cuja produção não foi afetada por NO. De acordo com esses achados, as células Th1 e Th2 podem ser distinguidas por diferentes padrões de citocinas produzidas e diferentes susceptibilidades 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 (Sicher & Vazquez, 1994).

Na hanseníase, o NO desempenha importante papel na destruição do *M. leprae*. Avaliando a expressão de iNOS e TGF- $\beta$  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 VV. A positividade para TGF- $\beta$  foi maior nos VV, sugerindo supressão da resposta imunológica por excesso de antígeno; nos pacientes em reação reversa, essa imunomarcação foi ausente, indicando desregulação no balanço iNOS/ TGF- $\beta$ . O TGF- $\beta$  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. Por outro lado, a produção de TGF- $\beta$  pode ser responsável pela fibrose dos nervos, observada após a reação reversa.

Schön et al (2001) detectaram, em pacientes dimorfos não tratados com e sem reação reversa, a produção de NO e peroxinitrito, por meio de anticorpos anti-iNOS e anti-nitrotirosina (NT). Observaram forte

imunoreatividade de iNOS e NT nos macrófagos dos granulomas, e infiltrando nervos dérmicos, indicando que os reativos intermediários de nitrogênio (RNI) podem estar envolvidos no dano neural. Os queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais próximas a reação granulomatosa também foram imunomarcados. A expressão de iNOS e NT foi semelhante e presente em todos os pacientes.

### 1.8. Reação tipo 1

Um aspecto interessante da hanseníase na faixa tuberculóide é que, provavelmente devido a baixa antigenicidade do *M. leprae*, as lesões cutâneas em geral não mostram sinais inflamatórios intensos, apresentando tom acobreado, desprovido de brilho, sendo secas. Do ponto de vista histopatológico, os granulomas dispõem-se em gomos bem delimitados, ramificados, sem extensão ao interstício (lesões tórpidas) (Ridley, 1987; Job, 1994). Em alguns indivíduos, no entanto, lesões tórpidas, de maneira mais ou menos abrupta, se tumefazem, tornando-se eritematosas e novas lesões satélites aparecem (Opromolla & Fleury, 1978). Outros indivíduos id apresentam, *ab-initio*, lesões eritemato- edematosas disseminadas (pdpulas, placas, nódulos), as quais podem sofrer necrose e ulceração. 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 (Souza Campos & Rath de Souza, 1954). Esse tipo de reação, que envolve hipersensibilidade, é denominada por Jopling de reação tipo 1 (Jopling, 1978).

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 características das lesões, assumiam características semelhantes aos virchovianos. Eram, pois, instáveis e, na classificação de Madrid, foram incluídos no grupo Dimorfo (Dharmendra, 1994). Outros indivíduos 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 Tuberculídes reacionais. Na classificação de Madrid, identificam-se como Tuberculóides major (Wade, 1934), mas na classificação de Ridley e Jopling (1962 e 1966) não há referência a essa manifestação que, provavelmente, foi incluída no subgrupo dimorfo- tuberculóide.

Ridley, no entanto, em 1987, em seu excelente opúsculo "Skin biopsies in leprosy, 2 ed.", referiu dois subtipos no pólo tuberculóide. Um, de resistência máxima *ab-initio*, em que as lesões eram poucas ou solitárias e tendiam à cura espontânea, e que recebeu a denominação de Tuberculóide primário. Outro, onde os indivíduos apresentavam, inicialmente, quadro clínico com características DT, mas que na evolução, por meio de reações com características de hipersensibilidade 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 secundário.

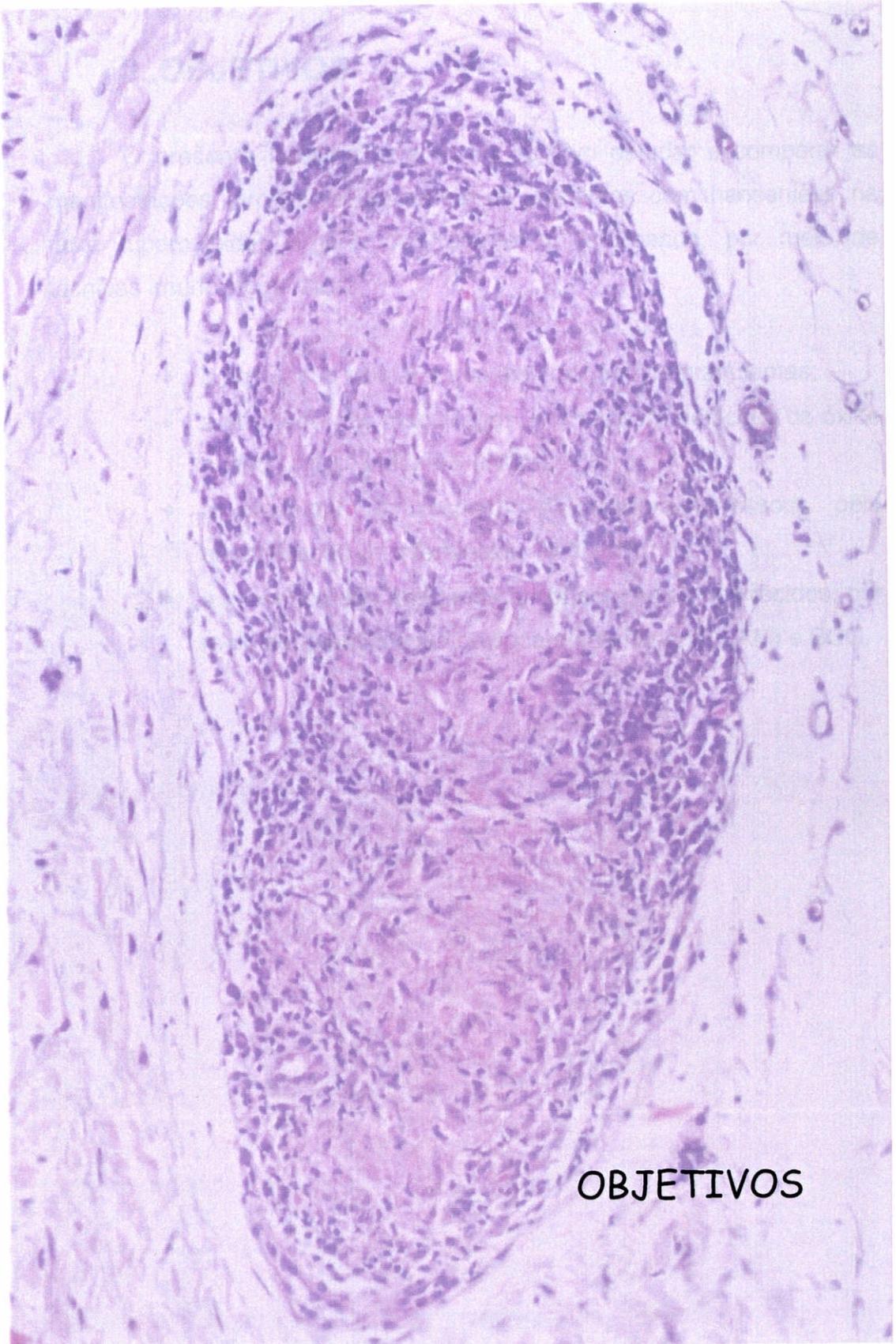
Lastoria et al (1998) estudaram os dimorfo-tuberculóides reacionais (DTR) e os tuberculóides reacionais (TR) por meio do teste de Mitsuda seriado (30, 60, 90, 120 dias). Verificaram que os TR apresentavam sempre reação de Mitsuda positiva e, em geral, mantinham o quadro granulomatoso dos 30 aos 120 dias,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

Estudos imunoistoquímicos em biópsias de lesões de pacientes com reação tipo 1, denominadas, na literatura inglesa, reação reversa, demonstram aumento de células CD4+ na lesão (Yamamura et al., 1992; Little et al, 2001). 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- $\gamma$  (Modlin et al.,1988). A expressão de mRNA para IL- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, INF- $\gamma$  e IL-12 (Verhagen et al, 1997) está igualmente aumentada tanto nos DT-RR como nos DV-RR, permanecendo fixas as taxas CD4/CD8, entre 1,7 e 1,8:1 (Little et al, 2001).

Na literatura, 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, apresentam resultados conflitantes. Yamamura et al. (1992) referem níveis diminuídos de mRNA para IL-4, IL-5 e IL-10, em biópsias de pacientes DD em reação reversa, quando comparados com DV não reacionais . Recentemente, porém, foi observado que esses episódios estão associados com elevados níveis de citocinas, incluindo as pró-inflamatórias (IL-12, INF $\gamma$  e TNF $\alpha$ ), e as antiinflamatórias (IL-10 e TGFP) 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 (Atkinson et al., 2004). Na reação tipo 1, também foi relatada a presença de iNOS no citoplasma dos macrófagos dos pacientes dimorfos reacionais (Yamamura et al, 1992), porém em nível menor do que nos TT (Khanolkar 1998). Essa positividade correlacionou-se com a presença de INF- $\gamma$  e IL-12 (Little et al, 2001).

Nenhuma diferença significativa da atividade NK foi evidenciada na hanseníase entre os pacientes com reação reversa e os não reacionais, notando-se, nos pacientes reacionais, uma correlação entre a atividade NK e a positividade A Reação de Mitsuda (Converse & Bjune, 1986).

Os diferentes comportamentos referidos na faixa tuberculose do espectro da hanseníase podem estar ligados a diferenças na imunidade celular entre os TT e os DT, e entre as manifestações tóxicas e reacionais, bem como a carga antigênica presente nos tecidos no momento da deflagração da reação imunocelular.

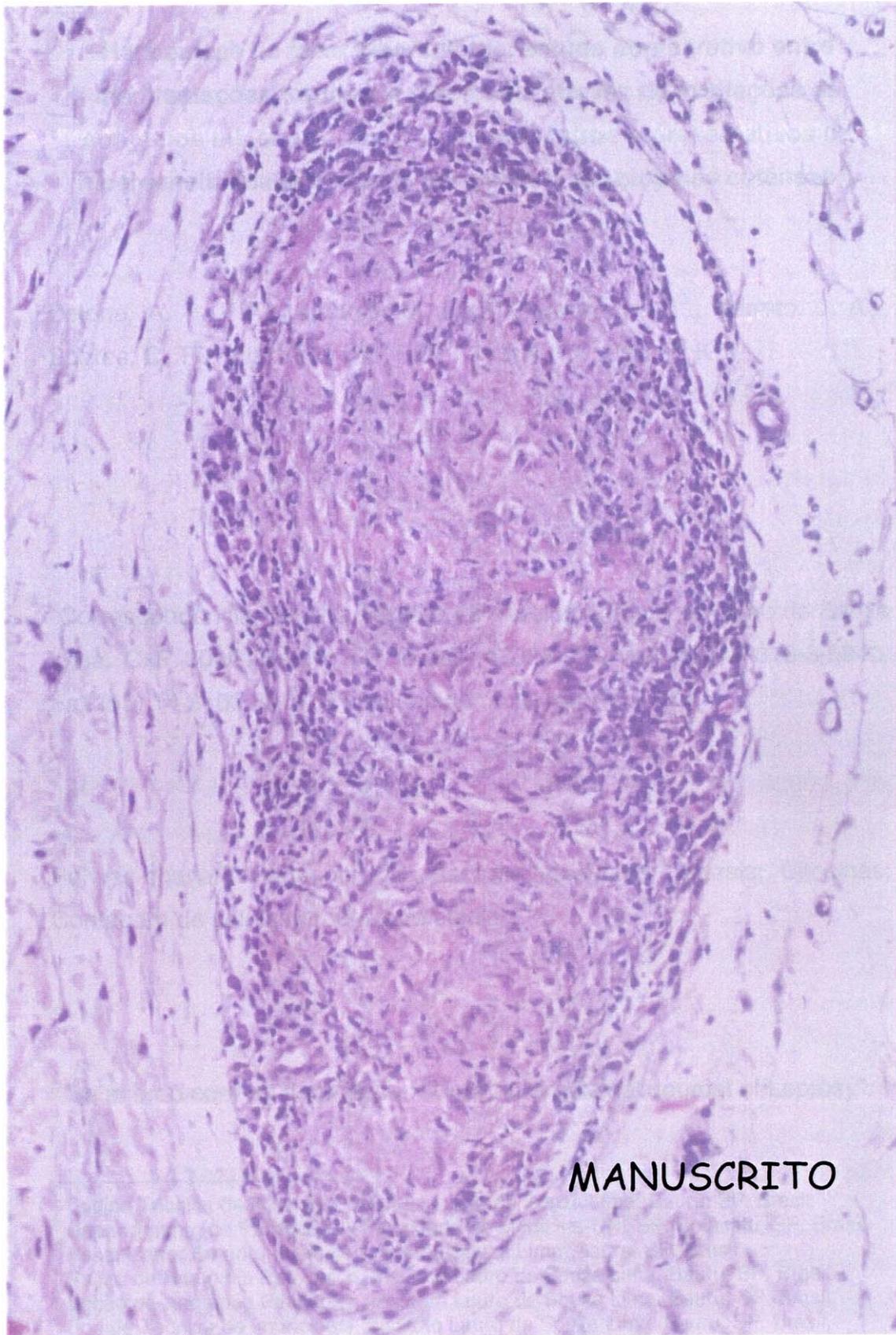


OBJETIVOS

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho teve como objetivo estudar e comparar as manifestações tórpidas e reacionais de pacientes com hanseníase na faixa tuberculóide, virgens de tratamento, analisando, por meio de técnicas imunoistoquímica:

- ❖ a população celular e sua distribuição nos granulomas;
- ❖ a atividade dos macrófagos, por meio da detecção da 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 BCG.



MANUSCRITO

**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 #**

Belone, A. F. F<sup>1\*</sup>., Marques, M. E. A<sup>2</sup>., Fleury, R. N<sup>3</sup>., Barreto, J. A<sup>4</sup>., Soares, C. T<sup>5</sup>., Vilani-Moreno, F. R<sup>6</sup>., Naafs, B<sup>7</sup>., Das, P. K<sup>8</sup>.

\*Correspondência: Equipe Técnica de Patologia, Instituto Lauro de Souza Lima. CxP 3012. Bauru. SP. Brasil. 17034-971. Tel (55)14 310-3-5910. Fax (55) 14 3103 5914. [E-mail: epidemi@ils.br](mailto:epidemi@ils.br)

Palavras-chave: Antígenos; Células exterminadoras naturais; Citocinas; Contagem de células; Imunidade celular

"De acordo com as normas da revista "International Journal of Leprosy".

---

<sup>1</sup> Equipe Técnica de Patologia, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

<sup>2</sup> Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina-UNESP. Botucatu, SP. Brasil.

<sup>3</sup> Pesquisador Emérito, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

<sup>4</sup> Seção de Anatomia Patológica, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

<sup>5</sup> Seção de Anatomia Patológica, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

<sup>6</sup> Equipe Técnica de Imunologia, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

<sup>7</sup> Department of Dermatology, Leiden University Medical Centre, The Netherlands.

<sup>8</sup> Department of Pathology, Amsterdam Medical Centre, The Netherlands.

## Introdução

A hanseníase é doença infecciosa, de evolução crônica, causada pelo *Mycobacterium leprae*. Apresenta, em qualquer das suas manifestações dentro do espectro clínico, histopatológico, baciloscópico e imunológico, proposto por Ridley e Jopling<sup>26,27</sup>, lesões cutâneo-neurais de evolução lenta, progressiva, com escassos sinais inflamatórios, denominadas lesões tórpidas. No entanto, por vezes, ocorrem episódios agudos caracterizados por múltiplas lesões eritematosas, edematosas, as quais inclusive sofrem necrose e ulceração, sobre e/ou ao lado das lesões tórpidas preexistentes<sup>32</sup>. Na faixa do espectro de maior resistência, ou faixa tuberculóide, estes episódios têm, como base, reação granulomatosa extensa, confluyente, associada à congestão, edema intracelular e intersticial, deposição de fibrina e, por vezes, focos de necrose e ulceração, e recebem a denominação de reação tipo 1 de Jopling<sup>14</sup>. Na faixa de menor resistência do espectro, ou faixa virchoviana, há episódios agudos caracterizados por dilatação vascular e exsudação serofibrinoneutrófila sobre granulomas macrofágicos regressivos, por vezes incluindo trombozes vasculares, abscedação, vasculites e necrose, definidos como reação tipo 2 de Jopling, ou eritema nodoso hansênico<sup>13</sup>. Há uma parcela de indivíduos classificados, na faixa tuberculóide do espectro, que desenvolvem quadro reacional tuberculóide ab-initio, caracterizado por aparecimento mais ou menos abrupto de múltiplas pápulas, placas e nódulos. Por apresentarem múltiplas lesões de padrão tuberculóide, esses indivíduos são, pelos parâmetros atuais, classificados como dimorfo-tuberculóides reacionais (DTR). Distinguem-se, no entanto, dois comportamentos diferentes neste grupo. Alguns indivíduos mantêm baciloscopia permanentemente positiva, sintomas neurológicos evidentes, edema de extremidades e discreto comprometimento do estado geral; outros têm baciloscopia negativa ou apenas transitoriamente positiva, sem manifestações sistêmicas, e os sintomas neurológicos são discretos ou

ausentes". Souza Lima & Souza Campos estudaram essas manifestações reacionais na era pré-sulfônica e evidenciaram que os indivíduos com o primeiro padrão de comportamento mostravam teste de Mitsuda fracamente positivo ou negativo, e tendiam a modificar suas características clínicas, assumindo aspectos progressivamente semelhantes aos virchovianos. Dentro da classificação de Madrid, foram incluídos no grupo dimorfo<sup>3</sup>. O segundo padrão incluía indivíduos com teste de Mitsuda positivo os quais, após um ou mais episódios reacionais, tendiam a cura espontânea, e que foram denominados Tuberculóides reacionais (TR). Estas manifestações estariam incluídas na classificação de Madrid como Tuberculóides major<sup>3,39</sup>. Na classificação de Ridley e Jopling<sup>26,27</sup>, os TR não são reconhecidos e, provavelmente, foram incluídos no grupo dimorfo. Mais tarde, no entanto, Ridley<sup>28</sup> considerou duas manifestações no pólo tuberculóide, ou seja, o tuberculóide pleno, ou hanseníase TT primária (TTp), que evolui a partir da hanseníase indeterminada, com lesões solitárias ou escassas; a outra manifestação inclui casos onde os indivíduos apresentam características clínicas semelhantes aos dimorfo-tuberculóides (DT), porém evoluem com lesões mais destrutivas e com sinais de hipersensibilidade, e recebem a denominação de hanseníase Tuberculóide secundária (Us). Como os TTp, foram incluídos dentro do 17 demonstraram, por meio de biópsias em testes de Mitsuda pólo tuberculóide.

Lastoria et al<sup>17</sup> seriados, que os TR evidenciaram índices de positividade baciloscópica menores e uma maior capacidade de "clearance" bacilar que os DTR.

Os trabalhos e revisões mais recentes sobre imunopatologia de hanseníase dão ênfase a dois padrões de citocinas teciduais relacionadas às manifestações polares. Nas lesões tuberculóides, há produção de citocinas do tipo Th1, ou seja, interleucina 2 (IL-2), que induz a proliferação de linfócitos T; INF $\gamma$  (interferon gama), que induz a ativação macrófágica, com produção de TNF $\alpha$ <sup>92,23</sup>, citocinas que, juntas,

estimulam a produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS)<sup>16,18,29</sup>. Por outro lado, nas lesões virchovianas, existe um predomínio do perfil Th2, com produção de IL-4 e IL-10, que suprimem a imunidade celular, estimulando a imunidade humoral não protetora<sup>22,31,34</sup>

Mais recentemente, propõem-se quatro tipos de resposta imune adaptativa: Th0, ou inicial, que pode derivar para Th1, na presença de altos níveis de IL-12, ou para Th2, quando em presença predominante de IL-4 e IL-10. Em ambas as respostas, há sempre uma modulação por citocinas da resposta Th3, ou reguladora, mediada principalmente por IL-10<sup>140</sup>

Do ponto de vista da identificação da população celular, há um modelo para a Hanseníase tuberculóide, proposto desde 1983, e que permanece citado até trabalhos mais recentes, com algumas modificações<sup>120</sup>. É postulado que, nos granulomas tuberculóides, os linfócitos CD4+ estão justapostos aos macrófagos no interior dos granulomas, e que linfócitos CD8+, predominantemente citotóxicos estão restritos ao halo que contorna o granuloma. As células CD4+ presentes no interior dos granulomas são linfócitos T de memória, e as células T-naive estão localizadas no halo linfocitário, perto das células CD8+<sup>21</sup>.

Os diferentes comportamentos referidos na faixa tuberculóide do espectro da hanseníase podem estar ligados a diferenças na imunidade celular entre os TT e os DT, e entre as manifestações tórpidas e reacionais. Nesse sentido, nos propomos a estudar, em biópsias de lesões tórpidas e reacionais na faixa tuberculóide do espectro, por técnicas imunoistoquímicas, a população celular, a atividade dos macrófagos por meio da detecção de iNOS, a presença de resposta moduladora/supressora pela quantificação da IL-10 e a presença dos antígenos micobacterianos nos tecidos, confrontando os resultados com os quadros histopatológicos correspondentes.

## **Materiais e Métodos**

### **Casuística:**

Foram selecionadas, do arquivo do Instituto Lauro de Lima, biópsias cutâneas de 10 indivíduos de cada grupo de manifestações (TT, DT, TR, DTR), virgens de tratamento, com diagnóstico clínico confirmado pelo exame anátomo-patológico. A idade dos pacientes variou entre 11 e 84 anos. A classificação histopatológica de cada grupo seguiu os critérios proposto por Ridley (1971)<sup>3</sup> e que foram usados no trabalho de Lastória et al.<sup>17</sup>

TT — Granulomas bem delimitados, de células epitelióides bem diferenciadas, com halo linfocitário de densidade variada; agressão neural intensa sem identificação de ramos nervosos ou apenas detecção de fragmentos de nervos no interior dos granulomas; agressão focal à epiderme. Baciloscopia de 0 a 1+ (Escala de Ridley)<sup>28</sup>.

TR — Granulomas extensos, mal delimitados, de células epitelióides bem diferenciadas, com extensão ao interstício e confluentes; edema intracelular e intersticial; eventual deposição intersticial de fibrina, focos de necrose principalmente ao longo de ramos nervosos; agressão freqüente à epiderme e agressão inconstante a ramos nervosos. Baciloscopia: 0 a 1+.

DT — Granulomas de células epitelióides bem diferenciadas, porém mais frouxos que os granulomas TT; halo linfocitário de densidade variada, ramos nervosos comprometidos ou preservados são identificados com maior facilidade; não há agressão epidérmica. Baciloscopia: 2+ ou mais.

DTR — O padrão geral é semelhante ao TR, porém os focos de necrose são raros, não há agressão à epiderme e os ramos nervosos são identificados com maior facilidade. Baciloscopia: 2+ ou mais.

Não se incluiu a avaliação de células gigantes tipo Langhans ou tipo corpo estranho como caracterização dos grupos porque a sua

presença é muito variada em um mesmo grupo e, principalmente nos episódios reacionais em biópsias de áreas cutâneas expostas, as células gigantes fagocitam fibras elastóticas fragmentadas, representando mais uma reação do tipo corpo estranho secundária do que uma reação específica ao *M. leprae*<sup>6</sup>.

### **Biópsia Cutânea:**

Cortes histológicos seriados de 5 µm de espessura foram corados pela Hematoxilina-Eosina (HE) e o Faraco-Fite para classificação histopatológica de cada grupo estudado e empregados para o estudo imunoistoquímico.

### **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 ).

### **Anticorpos policlonais**

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

### **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 En Vision+ (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, CD8, CD20, CD79 e iNOS. Após o 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' tetrahidrocloreto de diaminobenzidina)(Sigma) e contracoradas em hematoxilina de Harris.

A imunomarcagem para IL-10 seguiu o método ABC com o Kit Vectastain Elite (Vector Lab./6102), de acordo com Hsu et al.<sup>12</sup>, 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)<sup>11</sup>, 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 antipopulação celular, foram utilizadas amídalas e, para os anticorpos anti-LAM, anti-BCG e anti-IL-10, foram utilizadas biópsias de pele com diagnóstico de hanseníase virchoviana, incubadas com os anticorpos primários, respectivamente. Os controles negativos foram obtidos omitindo-se os anticorpos primários, os quais foram substituídos por PBS.

### **Avaliação dos cortes histológicos submetidos a imunoistoquímica**

O número de linfócitos T CD4+, TCD6+, células NK e células com expressão de IL-10 positivas foi obtido contando-se 15 campos de 0,0625mm<sup>2</sup>, sendo 5 campos na derme papilar, 5 na derme reticular média e 5 na profunda, sorteados no aumento de 400x.

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

As células iNOS positivas foram avaliadas por 4 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+ = > 20% células marcadas.

Os antígenos micobacterianos, assim como os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR), foram verificados em todo o corte histológico com os anticorpos anti-Micobacterium bovis, anti-LAM e com Faraco-Fite, utilizando-se a escala de 0 a 6+ de acordo com Ridley (1971)<sup>3</sup>. A representação morfológica dos antígenos micobacterianos mostrou fragmentos antigênicos bem individualizados, permitindo contagem igual à empregada para os bacilos em cortes corados pela técnica do Faraco-Fite.

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos de cada grupo estudado foram submetidos à análise estatística por meio do método não-paramétrico Kruskal-Wallis. Para as variáveis significativas, foram aplicados os teste de comparação múltipla, de Dunn (1964) e o 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-se em conta a dependência entre as áreas. Para as variáveis que apresentaram

diferença significativa, foi aplicado o teste de Dunn. Para análise de correlação entre todos os marcadores, utilizou-se o Teste de Person. 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

Os resultados da avaliação imunoistoquímica estão nas tabelas 1 e figura 1, 2, 3 e 4.

Analisando a população de linfócitos T, o número de linfócitos T CD4+ no grupo TT foi maior, estatisticamente, que nos grupos DT e DTR ( $p < 0,05$ ); e as células T CD8+ não diferiram nos grupos estudados. A relação CD4+/CD8+ não apresentou diferença significativa entre as quatro manifestações avaliadas, sendo TT:1,5/1; DT:1,311; TR:1,6/1 e DTR: 1,3/1.

Os linfócitos B CD20+ e CD79+ foram detectados em maior número nos reacionais ( $p < 0,01$ ), com diferença estatística entre as manifestações TR x TT e DTR x TT; o CD79+ também apresentou diferença significativa com o grupo DT (TR x DT e DTR x DT) ( $p < 0,05$ ).

As células NK foram observadas em maior número nas manifestações tórpidas ( $p < 0,01$ ), diferindo significativamente entre os grupos TT x TR e TT x DTR ( $p < 0,05$ ).

A distribuição das células nos granulomas foi mais ou menos constante em todos os grupos, ou seja, os linfócitos T CD4+ e CD8+ misturavam-se nos halos linfocitários tanto superficiais como profundos. No interior dos granulomas o número de linfócitos era mínimo em relação ao halo linfocitário, encontrando-se tanto linfócitos T CD4+ e CD8+ como linfócitos B e células NK. Os linfócitos B CD20+ e CD79+, em geral, estavam esparsos nos granulomas superficiais, e nos granulomas do derma médio e profundo formavam aglomerados densos, estelares, principalmente no halo periférico. Esse fato dificultou a contagem quantitativa dessas células e, por isso, a avaliação foi semiquantitativa. Estatisticamente, essa distribuição dos linfócitos B foi significativa em todos os grupos avaliados (Teste de Friedman,  $p < 0,05$ ).

As células marcadas com anticorpo anti-CD68+ (macrófagos jovens, células epitelióides e células gigantes multinucleadas) não foram

quantificadas, pois essa marcação foi utilizada apenas com a finalidade de avaliar a relação destas células com os outros tipos celulares no infiltrado.

Os resultados referentes à expressão da enzima iNOS evidenciaram imunomarcação em todas as manifestações estudadas. Foram observadas células iNOS+ em maior número nas manifestações Tórpidas ( $p < 0,01$ ), com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos TT x TR, TT x DTR e DT x TR, DT x DTR ( $p < 0,05$ ), analisando-se a derme total. Diferenças estatísticas foram observadas entre TT x DT ( $p < 0,05$ ) quando se avaliou o derma médio e profundo. As células marcadas com iNOS, observadas nos granulomas, foram células gigantes multinucleadas, células epitelióides, macrófagos jovens e neutrófilos. A intensidade da marcação variou nos granulomas e tipos celulares. Em todos os grupos avaliados foram encontradas células mononucleares iNOS+, intensamente coradas, e localizadas na periferia do granuloma.

A análise estatística da quantificação de células IL-10+, nos diversos grupos, detectou valores maiores e significantes nas manifestações reacionais ( $p < 0,01$ ), sendo observados entre os grupos TR x TT, DTR x TT, TR x DT e DTR x DT ( $p < 0,05$ ). A imunomarcação para IL-10 foi detectada em células mononucleares, apresentando padrão granular. Não foram observadas células IL-10+ no interior dos granulomas. Observou-se depósito granular em células mononucleares, principalmente na periferia dos granulomas.

A imunistoquímica ampliou a detecção de antígenos micobacterianos de 30 para 70% das biópsias nos TT, e de 60 para 100% nos TR, permanecendo, porém, quantitativamente em 1+. Nos casos com índice bacilar (IB) maior ou igual a 2+, não houve aumento significativo da positividade, porém houve ampliação da visibilidade, sendo possível a detecção dos antígenos já no aumento de 400x.

Empregando-se a correlação de Person, detectou-se correlação positiva entre baciloscopia, LAM, BCG e CD20; entre células NK e iNOS;

entre NK e CD4; entre CD20 e CD79; entre IL-10 e CD79. Correlação negativa foi observada entre iNOS e CD20; entre iNOS e CD79; entre NK e IL-10 ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 1.** Avaliação da população de células e interleucina 10, por meio de técnicas imunohistoquímicas, em biópsias cutâneas de pacientes com hanseníase na faixa tuberculóide, apresentando manifestações tórpidas (TT e BT) e reacionais (TR e DTR), 10 indivíduos por manifestação.

Clínica		Quantitativa			Semi quantitativa b		
		CD4+	CD8+	CD57+	IL-10+	CD20+	CD79a+
TT	Média	1665,23	1094,21	412,60	24,11		
	DP	345,06	317,87	189,87	21,51		
	Mediana	1738,28	1112,48	462,00	19,43	2	1
	Amplitude	911,25 - 2094,9	735,00 - 1839,90	89,0 - 711,0	4,5 - 70,95	1 - 3	1 - 2
DT	Média	1263,90	941,07	276,35	31,97		
	DP	343,9	319,37	238,61	45,55		
	Mediana	1207,80	849,98	210,25	9,0	2	1,50
	Amplitude	647,1 - 1789,95	672,75 - 1719,9	27,0 - 861,0	1,95 - 139,95	2 - 3	1 - 2
TR	Média	1500,44	952,68	161,10	84,73		
	DP	457,66	400,63	113,80	66,07		
	Mediana	1674,9	1016,83	133,50	72,90	3	2
	Amplitude	653,25 - 1989,9	276,6 - 1629,0	16,0 - 425,0	9,0 - 211,95	2 - 3	2 - 3
DTR	Média	1289,81	1011,77	133,70	71,34		
	DP	372,43	223,11	118,99	56,60		
	Mediana	1339,95	1004,10	90,50	61,50	3	2,50
	Amplitude	672,0 - 1918,2	645,0 - 1428,3	20,0 - 377,0	15,0 - 168,0	2 - 3	2 - 3
Tórpido	Média	1464,56	1017,64	344,48	27,83		
	DP	393,45	319,92	221,20	34,20		
	Mediana	1550,78	930,83	280,00	12,90	2	1
	Amplitude	647,1 - 2094,9	672,75 - 1839,9	27,0 - 861,00	1,95 - 139,95	1 - 3	1 - 3
Reacional	Média	1395,12	982,22 ± 317,06	147,40	78,43		
	DP	420,23		114,19	60,26		
	Mediana	1385,78	1014,98	109,50	72,90	3	2
	Amplitude	653,25 - 1989,9	276,6 - 1629,0	16,0 - 425,0	9,0 - 211,95	2 - 3	2 - 3

TT - Tuberculóide tórpida ou primária (Ridley)

DT - Dimorfa-tuberculóide,

TR - Tuberculóide reacional /Tuberculóide secundário (Ridley)

DTR - Dimorfo-tuberculóide reacional

Número total de células/mm<sup>2</sup>.

Escala de 0 a 4+: 0 = ausente; 1+ = mínimo; 2+ = discreto; 3+ = moderado; 4+ = intenso.

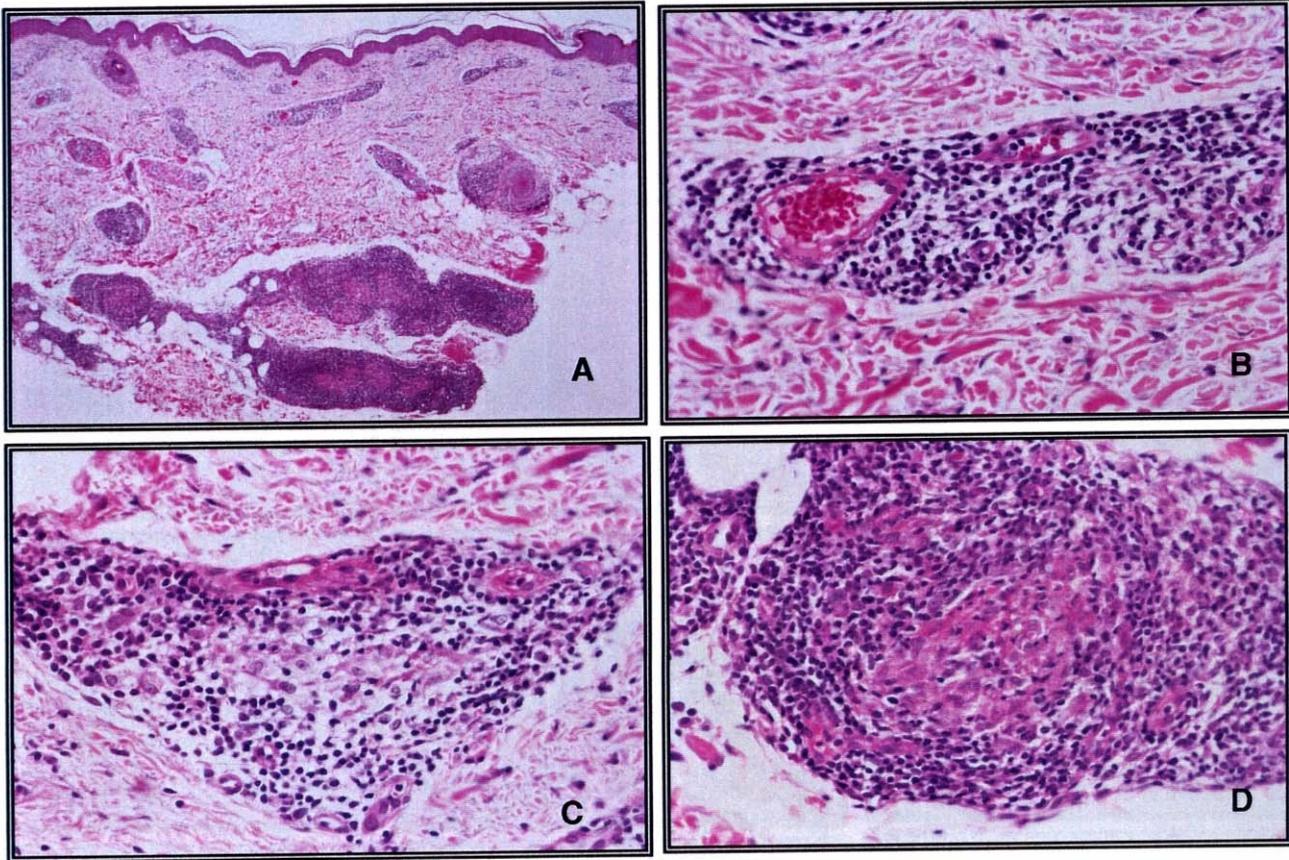


Figura 1: Hanseníase dimorfa-tuberculóide. Etapas na formação do granuloma. A: granulomas extensos, cordonais e granulomas focais no derma superficial e profundo (HE-50X). B: foco inflamatório superficial mostrando a relação dos linfócitos com vasos de pequeno calibre. Canto inferior direito: início de transformação epitelióide (HE-200X). C: foco superficial mostrando as mesmas relações com esboço granulomatoso mais evidente na área central e infiltrado linfocitário em torno de vasos (HE-200X). D: granuloma profundo definido com halo linfocitário mantendo sua relação com os vasos (HE-400X).

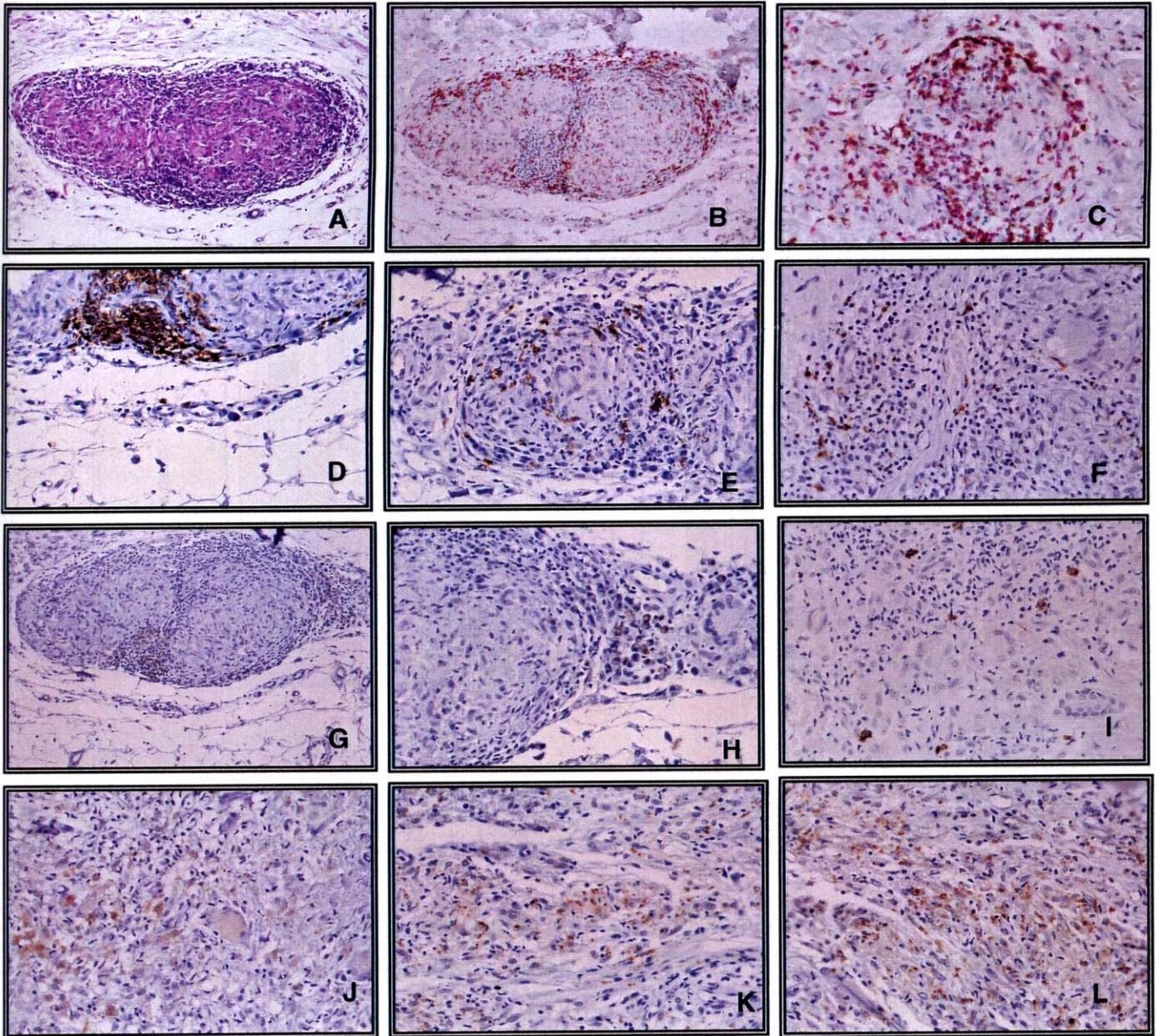
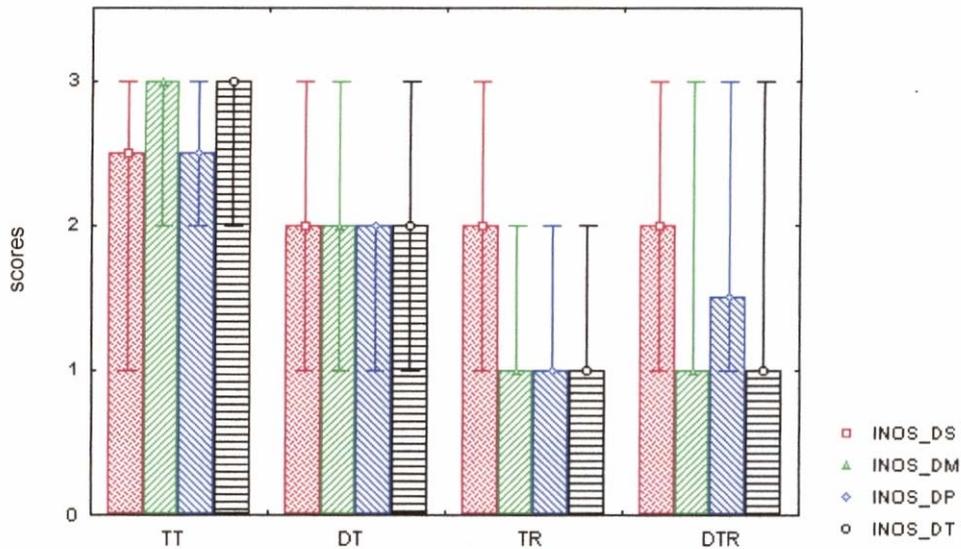


Figura 2: Hanseníase na faixa tuberculóide. Avaliação por imunistoquímica da população celular e células expressando IL-10 e iNOS. **A:** granuloma TR. (HE-100X); **B:** granuloma TR - dupla coloração com linfócitos CD4 (vermelho) e CD8 (marrom) no halo linfocitário e esparsos linfócitos no interior do granuloma (100X); **C:** granuloma TR — derma superficial: linfócitos CD4+ (vermelho) e CD8+ (marrom) entremeados na periferia e interior do granuloma em formação(200X); **D:** granuloma TR - derma profundo: linfócitos B CD20+ formando densos focos na periferia do granuloma (100X); **E:** granuloma TR - linfócitos CD20+ presentes no halo linfocitário e entre células epitelióides; **F:** granuloma TT - linfócitos anti-NK CD57+ no halo linfocitário e no interior do granuloma (200X); **G:** granuloma TR - linfócitos B ativados e plasmócitos CD79a+ em áreas focais no halo linfocitário (50X); **H:** granuloma TR - detalhe da figura anterior: plasmócitos em área focal no halo linfocitário(200X); **I:** granuloma TT — células IL-10+ na periferia do granuloma (200X); **J:** granuloma TT - gigantócitos, células epitelióides e macrófagos iNOS+ na periferia do granuloma (200X); **K:** granuloma BT - macrófagos e células epitelióides imunomarcados com anticorpo anti-BCG (200X); **L:** granuloma BTR - macrófagos e células epitelióides imunomarcados com anticorpo anti-LAM (200X).

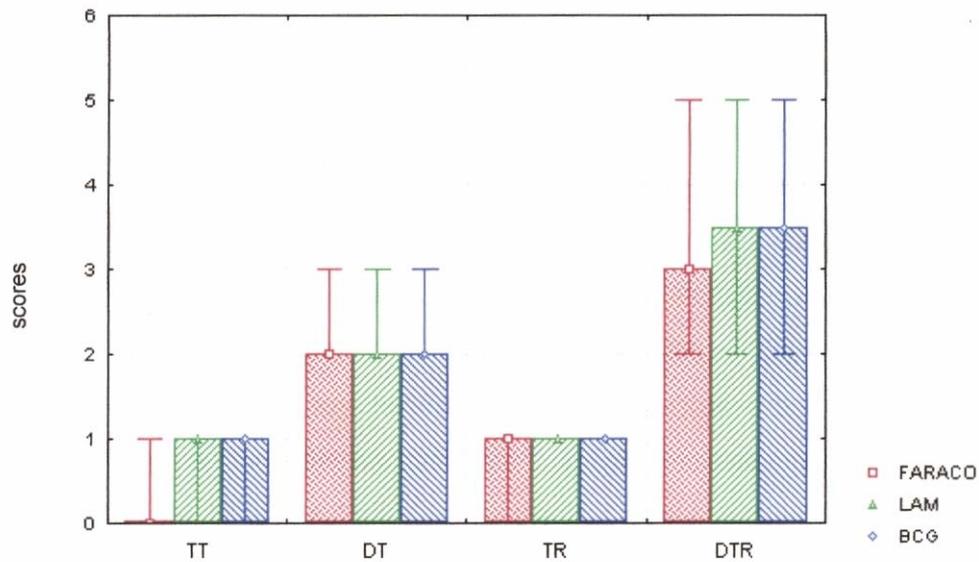
**Figura 3.** Avaliação semiquantitativa, por meio de técnica imunoistoquímica, de células expressando iNOS, na derme superficial, média, profunda e total, em biópsias de lesões cutâneas, em indivíduos classificados em 4 diferentes grupos na faixa tuberculóide do espectro da hanseníase.



Escala de 0 a 3 +. sendo: 0 = ausente; 1+ = 1 a 10% de células imunomarcadas; 2+ = 11 a 20% de marcadas; 3+ = > 20% células marcadas.

Estatisticamente significativo quando comparados os grupos TT x DT, na derme superficial e profunda; e TT x TR, e TT x DTR em todas as superfícies ( $p < 0,05$ ) (Testes de Kruskal — Wallis, Wilcoxon e Dunn).

**Figura 4.** Avaliação semiquantitativa, por meio de coloração de Faraco-Fite e técnicas imunistoquímicas, de antígenos micobacterianos, em biópsias de lesões cutâneas de indivíduos classificados em 4 diferentes manifestações na faixa tuberculóide do espectro da hanseníase.



- Escola de 0 a 6+, de acordo com Ridley (1971).
- Estatisticamente significativo quando comparados os grupos TT x DT, TT x DTR, DT x TR e DT x DTR ( $p < 0,05$ ) (Testes de Kruskal — Wallis, Wilcoxon e Dunn).

## Discussão

As características das manifestações clínicas e histopatológicas dos reacionais, na faixa tuberculóide, indicam associação de hipersensibilidade à imunidade protetora<sup>10,26,27,37</sup> Quando Ridley sugere que os TT secundários derivam de retardo no reconhecimento antigênico<sup>28</sup>, podemos deduzir que esse retardo propicia proliferação bacilar até níveis suficientes para desencadeamento de resposta imune celular. Portanto, a hipersensibilidade seria conseqüência do choque entre capacidade imune efetiva x carga antigênica elevada. Os índices baciloscópicos, sempre mais elevados nos reacionais do que nos tórpidos, e os achados de Souza Lima & Souza Campos de que a baciloscopia cutânea nos tuberculóides reacionais era transitoriamente positiva, falam a favor dessa hipótese. É interessante, a propósito, notar que o teste de Mitsuda, cuja carga bacilar por volume tecidual é muito alta, induz, em tuberculóides tórpidos, reação granulomatosa muito similar aos tuberculóides reacionais, por vezes com necrose e ulceração.

Uma outra hipótese patogênica para desenvolvimento de episódios reacionais, na faixa tuberculóide, é que indivíduos constitucionalmente resistentes venham a se infectar com grandes doses bacilares, ou que uma falha qualquer na imunidade inata facilite a penetração do *M. leprae* no organismo, permitindo que grande carga bacilar se acumule nos ramos nervosos sensitivos cutâneos e/ou nos segmentos preferenciais dos troncos nervosos. Em ambas as situações, as reações poderiam ser mais disseminadas, intensas e destrutivas.

Por esse motivo, incluiu-se a pesquisa de antígenos micobacterianos nos cortes histológicos, na tentativa de verificar se poderíamos detectar esses antígenos nos macrófagos e ramos nervosos, em uma apresentação diferente daquela propiciada pelo reconhecimento morfológico e tintorial dos bacilos<sup>38</sup>. Entretanto, empregando tanto anticorpo anti-BCG como anti-LAM, não se obteve aumento significativo

na detecção em pacientes multibacilares (DT e DTR). Nos casos paucibacilares, notou-se que a imunistoquímica foi capaz de mostrar antígenos bacilares em localizações preferenciais do bacilo (ramos nervosos, músculo eretor do pêlo e região subepitelial) de maneira mais eficaz do que a técnica de Fite-Faraco. Porém, esse aumento na detecção foi menor do que o relatado por outros autores<sup>2,5, 19, 24,30,35</sup>. Como na faixa virchoviana do espectro (VV e DV) os antígenos, não morfológicamente representados, são detectados com facilidade nos tecidos, acredita-se que a transformação epitelióide e a formação do granuloma tuberculóide signifiquem sempre uma efetiva capacidade de processamento antigênico, restando nos cortes apenas bacilos não processados, ou situados em locais ainda não atingidos pela reação imune (ramos nervosos, músculo eretor do pêlo e parede muscular de vasos)<sup>6</sup>.

Modlin refere um padrão de distribuição linfocitária nos granulomas TT, o qual vem sendo repetido na maioria dos trabalhos sobre a imunopatologia da hanseníase<sup>20</sup>. Nesse modelo, admite-se que no interior dos granulomas tuberculóides os linfócitos T CD4+ estariam em contato com as células epitelióides e, no halo linfocitário, predominariam linfócitos T CD8+<sup>5,21,31,3e</sup>. Não se encontrou este padrão em nenhum dos grupos estudados. O halo linfocitário, que, na verdade, representa a zona de influxo de novas células inflamatórias a partir de vênulas e capilares adjacentes, contém células CD4+, células CD8+, macrófagos não diferenciados, células dendríticas, células NK e linfócitos CD20+ e CD79a+. É possível que esse halo represente o local da efetiva atividade imune celular, e que, na medida em que os macrófagos processam efetivamente os antígenos, transformam-se em células epitelióides. O granuloma em formação seqüestraria, entre as células epitelióides, quaisquer células presentes no halo referido. Também nos cortes tangenciais aos granulomas podem se superpor células do halo linfocitário aos granulomas, criando uma falsa imagem das relações entre as células participantes do processo imune.

Os valores admitidos da proporção CD4+/CD8+ de 1,9/1, nas lesões tuberculóides<sup>21</sup>, não foram observados em neste trabalho. As quatro manifestações tuberculóides não mostraram diferenças consistentes (TT: 1,5/1; TR: 1,6/1; DT: 1,3/1; DTR: 1,3/1). Assim, acredita-se que estudos posteriores, com melhor identificação fenotípica e funcional dessas células, sejam necessários para melhor interpretação imunológica do granuloma tuberculóide. FAKHOURI et al (2003)<sup>5</sup>, comparando a população celular entre hanseníase tuberculóide nodular de infância e tuberculóide tórpida, encontraram valores dessa proporção nos TT ainda menores que os relatados nesta pesquisa.

Os estudos encontrados na literatura, sobre a detecção de iNOS na hanseníase, são conflitantes<sup>16,18,29</sup>. Encontrou-se, neste trabalho, valores elevados nos TT, semelhante aos achados por KHANOLKAR, e positividade também nos DT e reacionais, como no estudo de SCHON. Os valores de iNOS se relacionam paralelamente com os níveis de IFN $\gamma$  e IL-12<sup>18</sup>. A multiplicação progressiva do *M. leprae* estimula a expressão de altos níveis de TGF-R, que reduz a atividade macrófágica, e conseqüentemente a produção de iNOS<sup>8</sup>. Por outro lado, o processamento do bacilo levaria a uma redução na carga antigênica, com redução nos níveis de TGF-R, desencadeando uma resposta inflamatória desregulada<sup>18</sup>.

A presença de IL-10 em todas as manifestações estudadas está de acordo com a literatura<sup>1,22,31,41</sup>. Entretanto o alto nível de IL-10 presente nas lesões TR e DTR, cujos índices baciloscópicos são diferentes, sugere fontes e funções diferentes para esta citocina<sup>1,40</sup>.

Analisando os resultados obtidos na avaliação das células NK, linfócitos B, iNOS e IL-10, observaram-se padrões distintos entre as manifestações tórpidas e reacionais. Foi observada correlação positiva entre IL-10 e CD79+ (resposta Th2/Th3) e entre iNOS e células NK (resposta Th1). Houve correlação negativa entre IL-10 e NK, iNOS e CD79, e tendência negativa entre IL-10 e INOS.

Nos TT, os macrófagos jovens são capazes de eliminar rapidamente os bacilos, e, após o término do processamento antigênico, transformam-se em células epitelióides e células gigantes as quais, apesar de não possuírem mais atividade fagocitária, continuariam produzindo citocinas<sup>28</sup>, como IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ <sup>5</sup>, mantendo o granuloma ativo, independentemente da existência do antígeno. As células NK, presentes em maior número nos TT, podem ser estimuladas por IL-12 e IL-18 produzidas pelos macrófagos ativados<sup>4,7</sup>, e por IFN $\gamma$  e IL-2 produzidos pelo granuloma tuberculóide. Estas citocinas aumentam a atividade citotóxica das células NK e induzem a produção de IFN $\gamma$ , o qual mantém o granuloma, estimula a produção de iNOS+ e reduz a produção de IL-10 e IL-4, diminuindo a resposta Th2 e, conseqüentemente, o número de linfócitos B.

No grupo tórpido, comparando-se DT e TT, apesar de não haver diferenças estatisticamente significantes, foram observadas, nos DT, valores maiores de IL-10 e CD79a, e menor número de células NK. Houve, neste último grupo, significativamente maior índice baciloscópico, menor número de células CD4+ e, no derma médio e profundo, positividade menor para iNOS, sugerindo, em relação aos TT, menor imunidade celular.

Nas manifestações reacionais, observou-se expressão mais elevada de IL-10 e CD79+, e números menores de células NK e de células positivas para iNOS. Não houve, pelos parâmetros utilizados, diferenças estatisticamente significantes entre os TR e DTR, exceto pela baciloscopia maior nos DTR.

Os níveis de multiplicação bacilar podem levar à produção tanto de IL-10 quanto de IL-12 por macrófagos infectados. É possível que, nos pacientes DTR, devido a produção de IL-10 mais elevada e, dentro de um microambiente com tendência a imunidade humoral, houvesse estimulação da resposta Th2, com proliferação e ativação de linfócitos B, gerando uma resposta humoral/supressora. Esta inibiria a produção de

IFN $\gamma$  pelos linfócitos Th1 e células NK, diminuindo a produção de TNFa pelo macrófago. Como conseqüência, haveria redução da produção de iNOS, favorecendo a multiplicação bacilar e piora da infecção.

Já nos pacientes TR, haveria produção predominante de IL-12, levando ao um desenvolvimento da resposta Th1, com ativação dos macrófagos e conseqüente destruição dos bacilos. A presença de IL-10, neste caso, possivelmente dever-se-ia à ativação de células T CD4+/CD25+ (Th3) que, sob estímulo da IL-2 própria da resposta Th1, produziria IL-10, que estimularia a proliferação e ativação de linfócitos B, bem como sua ação como células apresentadoras de antígeno, levando à limitação do número de reações e tendência à cura.

Pode-se inferir que, na hanseníase, os comportamentos Th1, Th2 e Th3 não são excludentes entre si, pois na faixa tuberculóide do espectro identificaram-se células e citocinas do perfil Th2 num contexto de resposta imune celular predominante (Th1). Isso poderia significar um mecanismo para conter a perpetuação de uma atividade altamente destrutiva para os tecidos.

Também pode-se inferir que, na faixa tuberculóide, há uma situação paradoxal, ou seja, uma menor resistência natural e adquirida poderia propiciar, em uma primeira fase, acúmulo de antígenos nos tecidos, mas o indivíduo, guardando imunidade suficiente, e a partir de um certo nível de carga antigênica, reagiria de maneira mais intensa, por vezes com destruição tecidual, mas as vezes com maior efetividade que no indivíduo cuja resistência se desenvolve *ab initio*<sup>28</sup>. A diferença entre os TR e DTR residiria na maior eficiência e rapidez dos primeiros no bloqueio da proliferação bacilar e na limitação da invasão bacilar dos troncos nervosos. Os DTR, por isso, manteriam sempre um percentual de bacilos proliferando, mantendo episódios reacionais e tendência a piora, inclusive com comprometimento neurológico mais generalizado e severo.

## Resumo

Na faixa tuberculóide do espectro da hanseníase (Tuberculóides e Dimorfo-tuberculóides), identificam-se manifestações crônicas, de evolução lenta e progressiva, ou seja, hanseníase Tuberculóide tórpida (TT) e Dimorfa-tuberculóide (DT), e manifestações ab initio reacionais, de instalação abrupta, com lesões múltiplas, generalizadas, mostrando intensa atividade inflamatória, denominadas hanseníase Tuberculóide reacional (TR) e Dimorfa-tuberculóide reacional (DTR). Nesta última, os episódios reacionais se mantêm e tendem a piorar e, na hanseníase TR, a tendência é a resolução após um ou poucos episódios reacionais<sup>25</sup>.

Com o objetivo de pesquisar as causas desses diferentes comportamentos, confrontamos, em biópsias cutâneas de 10 pacientes de cada grupo (TT, DT, TR e DTR), os achados histopatológicos e baciloscópicos com a avaliação imunistoquímica da população celular, dos antígenos micobacterianos, da presença de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e de interleucina 10 (IL-10). De modo geral, a detecção dos antígenos micobacterianos correspondeu aos índices baciloscópicos, sugerindo que a transformação epitelióide é uma evidência do efetivo processamento dos antígenos micobacterianos. Não se detectaram diferenças significantes na distribuição da população linfocitária (CD4/CD8) nos diversos grupos, no entanto, valores significativamente maiores de NK+ e iNOS+ nos TT sugerem imunidade celular mais efetiva.

Em todos os grupos foram detectadas células IL10+ e infiltrado de linfócitos B e plasmócitos, com predomínio significativo nos reacionais. Esses dados sugerem que os comportamentos Th1/Th2 não sejam excludentes entre si, e que a resposta Th2 ou Th3 podem estar presentes em lesões predominantemente Th1, como uma tentativa de desarme de reação muito agressiva para os tecidos.

## Summary

In the tuberculoid pole of leprosy (Tuberculoid and Borderline Tuberculoid) chronic manifestations of insidious and progressive evolution are identified, that refers to Torpid Tuberculoid (TT) and Borderline Tuberculoid (DT). "Ab initio" reactional manifestations, with abrupt onset, multiple and generalized lesions showing intense inflammatory reaction are denominated Tuberculoid Reactional (TR) and Borderline Tuberculoid Reactional (DTR). In these last, the reactional episodes are maintained and tend to become worse, in the first manifestations mentioned, there a tendency to recovery after one or a few reactional episodes.

During the search for the causes of these different behaviors in biopsies of 10 patients of each group, we confronted the histopathological and bacilloscopic findings with the immunohistochemical evaluation of the cell population, of the mycobacterial antigens, the presence of induced nitric oxide sintase (iNOS) and interleukin 10 (IL10). Except for the TT and TR, the detection of mycobacterial antigens correspond to the bacilloscopic indexes, what suggests that the epithelial transformation is a consequence of the effective processing of mycobacterial antigens. We did not detect significant differences in the lymphocytes population distribution (CD4/CD8) in the several groups studied, however, significantly higher values of NK+ and iNOS in the TT group suggests a more effective cellular immune response.

IL10+ positive cells and B lymphocyte populations and plasma cells were found in all groups, with significant predominance in the reactional. This data suggests that the Th1/Th2 behaviors do not mutually exclude each other, and the Th2 or Th3 responses may be present in predominantly Th1 lesion, in a tentative to overcome very aggressive reactions to the tissue.

## Resumen

En la forma tuberculoide del espectro de la hanseníase (Tuberculoides y Dimorfa-tuberculoides), se identifican manifestaciones crónicas, de evolución lenta y progresiva, o sea, Tuberculoide tórpido (TT) y Dimorfa tuberculoide (DT), y manifestaciones "ab initio" reacciones, de instalación abrupta, con lesiones múltiples, generalizadas, mostrando intensa actividad inflamatoria, denominadas tuberculoide reacciones (TR) y dimorfa-tuberculoide reacciones (DTR). En este último, los episodios de reacciones se mantienen y tienden a empeorar, y en los primeros, la tendencia es la resolución después de uno o pocos episodios de reacciones.

Con el objetivo de investigar las causas de estos diferentes comportamientos, en biopsias de 10 pacientes de cada grupo (TT, DT, TR y DTR), confrontamos los descubrimientos histopatológicos y baciloscópicos con la evaluación inmunohistoquímica de la población celular, de los antígenos micobacterianos, de la presencia de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) e interleucina 10 (IL10). Excepto en los TT y TR, la detección de los antígenos micobacterianos corresponde a los índices baciloscópicos, sugiriendo que la transformación epitelióide es una consecuencia del efectivo procesamiento de los antígenos micobacterianos. No detectamos diferencias significativas en la distribución de la población linfocitaria (CD4/CD8) en los diversos grupos, no obstante, valores significativamente mayores de NK+ y iNOS en los TT sugieren inmunidad celular más efectiva.

En todos los grupos se detectaron células IL10+ e infiltrado de linfocitos B y plasmocitos, con predominio significativo en las reacciones. Estos datos sugieren que los comportamientos Th1/Th2 no sean mutuamente excluyentes, y que la respuesta Th2 o Th3 pueden estar presentes en lesión predominantemente Th1, como una tentativa de desarme de reacción muy agresiva para los tejidos.

## Résumé

Dans la chaîne tuberculoïde du spectre de la lèpre (tuberculoïdes et dimorpho-tuberculoïdes) s'identifient des manifestations chroniques, d'évolution lente et progressive, ou, tuberculoïde (torpido) (TT) et dimorpho-tuberculoïde (DT) et manifestations "ab initio" réactives, d'installation subite, avec lésions multiples, généralisées montrant une intense activité inflammatoire, dénomées tuberculoïde réactive (TR) et dimorpho-tuberculoïde réactive (DTR). Dans ce dernier, les épisodes réactifs se maintiennent et ont tendance à s'aggraver, et pour les premiers, la tendance est à la résolution après un ou quelques épisodes réactifs.

Avec l'objectif de rechercher les causes de ces différents comportements en biopsies de 10 patients de chaque groupe (TT,DT,TR et DTR), on a comparé les résultats histopathologiques et bacilloscopiques avec évaluation immunochimique de la population cellulaire, des antigènes microbactériens, de la présence d'oxyde nitrique synthé-induit (iNOS) et interleucine 10 (IL 10).

Excepté dans TT et TR, la détection des antigènes microbactériens correspond aux indices bacilloscopiques, suggérant que la transformation épithéliale est une conséquence de l'effectif processus des antigènes microbactériens.

Nous ne détectons pas de différences significatives dans la distribution de la population lymphocytaire (CD4/CD8) dans les divers groupes, pourtant, des valeurs significativement supérieures de NK+ et iNOS+ dans les TT suggèrent une immunité cellulaire plus effective.

Dans tous les groupes ont été détectées des cellules IL 10+ et l'infiltration de lymphocytes B et plasmatiques, avec prédominance significative des réactives. Ces données suggèrent que les comportements Th1/Th2 ne sont pas mutuellement excluants, et que en réponse Th2 ou Th3 peuvent

être présents en lésions prédominantes Th1, comma une tentative de desarmer une reaction très agressive pour les tissues.

### **Agradecimento**

À FUNDAÇÃO PAULISTA CONTRA A HANSENÍASE, pelo auxílio financeiro deste trabalho.

### Referências Bibliográficas

1. ATKINSON, S.E., KHANOLKAR-YOUNG, S., MARLOWE, S., JAIN, S., REDDY, R.G., SUNEETHA, S., and LOCKWOOD, D.N. 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.* **72** (2004) 27-34.
2. BARBOSA JR, A.A., SILVA, T. C., PATEL, B.N., SANTOS, M.I.R., WAKAMATSU, A., and ALVES, A.F. Demonstration of mycobacterial antigens in skin biopsies from suspected leprosy cases in the absence of bacilli. *Path. Res. Pract.* **190** (1994) 782-785.
3. DHARMENDRA. Classification of leprosy. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy*, 2nd. edn. New York: Churchill Livingstone, 1994, p.179-190.
4. DE LA BARRERA, S., FINIASZ, M., FINK, S., ILARREGUI, J., ALEMAN, M., OLIVARES, L., FRANCO, M.C., PIZZARIELLO, G., and DEL CARMEL SASIAIN, M. NK cells modulate the cytotoxic activity generated by *Mycobacterium leprae-hsp65* in leprosy patients: role of IL-18 and IL-13. *Clin. Exp. Immunol.* **135** (2004) 105-113.
5. FAKHOURI, R., SOTTO, M.N., MANINI, M.I.P., and MARGARIDO, L.C. Nodular leprosy of childhood and tuberculoid leprosy: a comparative, morphologic, immunopathologic and quantitative study of skin tissue reaction. *Int. J. Lepr.* **71** (2003) 218-226.

6. FLEURY, RN. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling — uma análise morfológica. *Hans. Int.* **14** (1989) 101-106.
7. GARCIA, V.E., UYEMURA, K., SIELING, P.A., OCHOA, M.T., MORITA, C.T., OKAMURA, H., KURIMOTO, M., REA, T.H., and MODLIN, R.L. IL-18 promote type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. *J. Immunol.* **162** (1999) 6114-6121.
8. GOULART, I.M.B. FIGUEIREDO, F., COIMBRA, T., and FOSS, N.T. Detection of transforming growth factor-b1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am. J. Pathol.* **148** (1996) 911-917.
9. GOULART, I.M.B, PENNA, G.O., and CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **35** (2002) 365-375.
10. HARBOE, M. Overview of host-parasite relations. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy*, 2nd. edn. New York: Churchill Livingstone, 1994, p.87-112.
11. HECKE, D.V. Sequential immunohistochemical double-staining using Envision Polymer technology. *The J. Histotechnol.* **24** (2001) 107-111.
12. HSU, S.M., RAINE, L. and FANGER, H. Using of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **29** (1981) 577-580.

13. JOB, C.K. Pathology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy*, 2nd. edn. New York: Churchill Livingstone, 1994, p.193-224.
14. JOPLING, W.H. Leprosy reactions (reactional states). In: *Handbook of leprosy*, 2nd edn. London: William Heinemann Med. Books, 1978, p.66-74.
15. KAUFMANN, S.H.E. Cell-mediated immunity. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy*, 2nd. edn. New York: Churchill Livingstone, 1994, p.157-168.
16. KHANOLKAR-YOUNG, S., SNOWDON, D., and LOCKWOOD, D.N.J. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TFG-(3) in leprosy lesions. *Clin. Exp. Immunol.* **113** (1998) 438-442.
17. LASTORIA, J.C., OPROMOLLA, D.V.A., FLEURY, R.N., HABERMANN, F., and CURT, P.R. Serial Mitsuda tests for identification of reactional borderline leprosy forms. *Int. J. Lepr.* **66** (1998) 190-200.
18. LITTLE, D., KHANOLKAR-YOUNG, S., COULTHART, A., SUNEETHA, S., and LOCKWOOD, D.N.J. 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.* **69** (2001) 3413-3417.
19. LOCKWOOD, D.N.J., COLSTON, M.J., and KHANOLKAR-YOUNG, S.R. The detection of *mycobacterium leprae* protein and

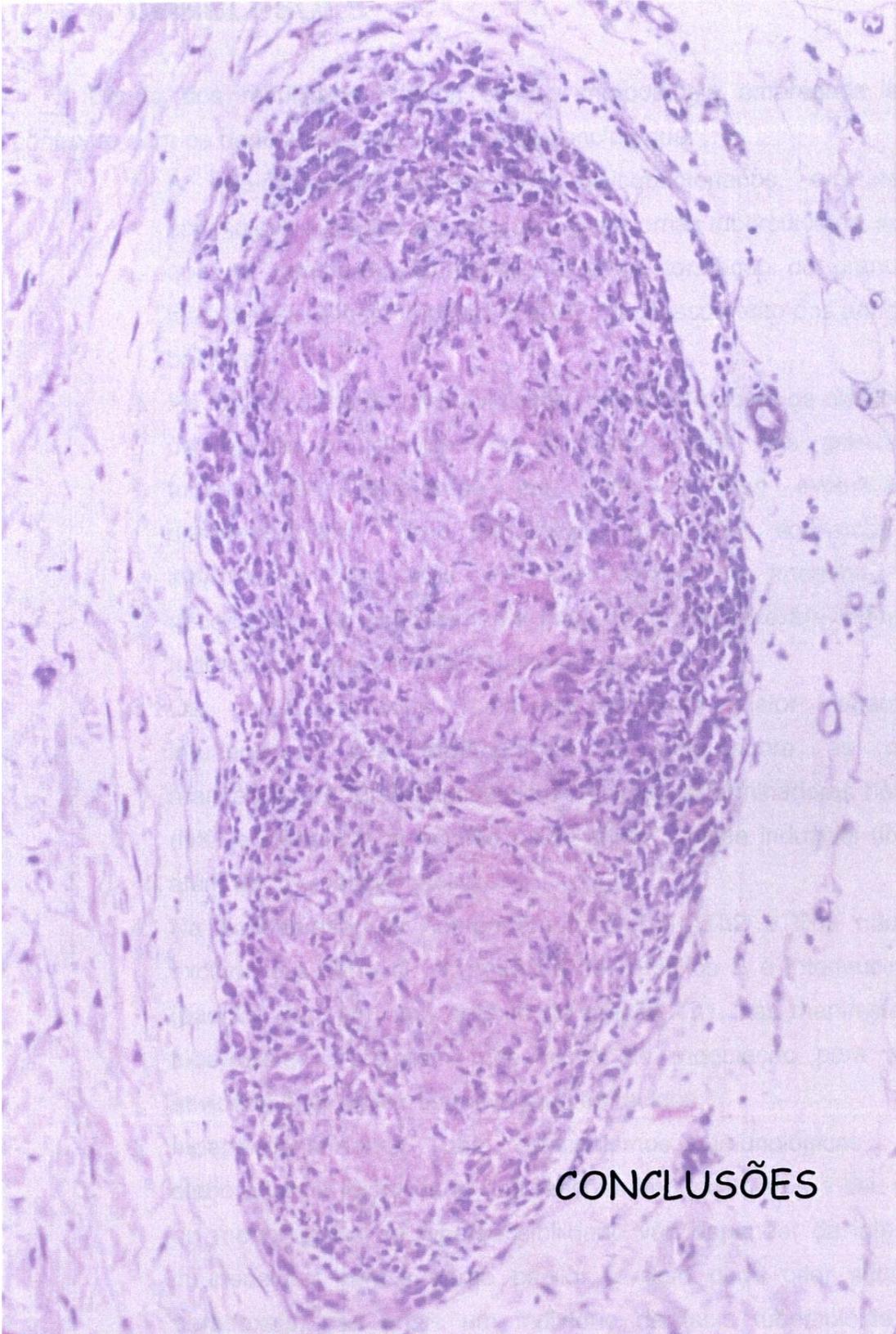
- carbohydrate antigens in skin and nerve from leprosy patients with type 1 (reversal) reactions. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66** (2002) 409-415.
20. MODLIN, R.L., HOFMAN, F.M., TAYLOR, C.R. and REA, T.H. T lymphocyte subsets in the skin lesions of patient with leprosy. *J. Am Acad. Dermatol.* **8** (1983) 182-189.
21. MODLIN, R.L., and REA, T.H. Immunopathology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. *Leprosy*, 2nd. edn. New York: Churchill Livingstone, 1994, p.225-234.
22. MODLIN, R.L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J. Invest. Dermatol.* **102** (1994), 828-832.
23. MODLIN, R.L. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.* **15** (2002) 1-6.
24. NATRAJAN, M., KATOCH, K., and KATOCH, V.M. Histology and immuno-histology of lesions clinically suspicious of leprosy. *Acta Leprol.* 11 (1999) 93-98.
25. OPROMOLLA, D.V.A. and FLEURY, R.N. Classification of leprosy. In: LATAPI, F., et al. *Leprosy. Proceedings of the XI International Leprosy Congress*, Amsterdam: Excerpta Medica, 1978, p.254-60.
26. RIDLEY, D.S., and JOPLING, W.H. A classification of leprosy for research purposes. *Lepr. Rev.* **33** (1962) 119-128.

27. RIDLEY, D.S., and JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int. J. Lepr.* 34 (1966) 255-273.
28. RIDLEY, D.S. *Skin biopsy in leprosy*. Switzerland: Ciba-Geigy, 2nd edn, 1987.
29. SCHÖN, T., HERNANDEZ-PANDO, R.H., NEGESSE, Y., LEEKASSA, R., SUNDQVIST, T., and BRITTON, S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *British J. Lepr.* **145** (2001) 809-815.
30. SHETTY, V.P., UPLEKAR, M.W., and ANITA, N.H. Immunohistological localization of mycobacterial antigens within the peripheral nerves of treated leprosy patients and their significance to nerve damage in leprosy. *Acta Neuropathol.* **88** (1994) 300-306.
31. SIELING, P.A., and MODLIN, R.L. T Cytokine patterns in leprosy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 730 (1994) 42-52.
32. SOUZA CAMPOS, N., and RATH DE SOUZA, P. Reactional states in leprosy. *Int. J. Lepr.* **22** (1954) 259-273.
33. SOUZA LIMA, L. and SOUZA CAMPOS, N. Léprides tuberculóides reacionais. In: *Lepra tuberculóide: estudo clínico-histopatológico*. São Paulo: Renascença, 1947, p.173-215.
34. TAGA, K., and TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-12 production. *J. Immunol.*, **148** (1992) 1143-1148.

35. TAKASHASHI, M.D., ANRADE Jr., H.F., WAKAMATSU, A., SIQUEIRA, S., and DE BRITO, T. Indeterminate leprosy: histopathological and histochemical predictive parameters involved in its possible change to paucibacillary or multibacillary leprosy. *Int. J. Lepr.* **59** (1991), 12-19.
36. VAN VOORHIS, W.C., KAPLAN, G., SARNO, E.N., HORWITZ, M.A., STEINMAN, R.M., LEVIS, W.R., NOGUEIRA, N., HAIR, L.S., GATTAS, C.R., ARRICK, B.A., and COHN, Z.A. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and predominant T-cell phenotypes. *J. Med.* **307** (1992) 1593-1597.
37. VERHAGEN, C.E, WIERENGA, E.A., BUFFING, A., FABER, W., KLATSER, P., NAAFS, B., and DAS, P.K. 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.* **159** (1997) 1470-1475.
38. VERHAGEN, C., FABER, W., KLATSER, P., BUFFING, A., NAAFS, B., and DAS, P. Immunohistological analysis of *in situ* expression of mycobacterial antigens in skin lesions of leprosy patients across the histopathological spectrum. Association of mycobacterial lipoarabinomannan (LAM) and mycobacterium leprae phenolic glycolipi-I (PGL-I) with leprosy reactions. *Am. J. Pathol.* **154** (1999) 1793-1804.
39. WADE, H.W. Tuberculoid changes in leprosy: II. Lepra reaction in tuberculoid leprosy. *Int. J. Lepr.* **2** (1934) 279-292.
40. WEISS, E., MAMELAK, A.J., LA MORGIA, S., WANG, B., FELICIANI, C., TULLI, A., SAUDER, D.N. The role of interleukin 10

in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **50**, p.657-675, 2004.

41. YAMAMURA, M., UYEMURA, K., DEANS, R.J., WEINBERG, K., REA T.H., BLOOM, B.R., and MODLIN, R.I. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* **254** (1991) 277-279.

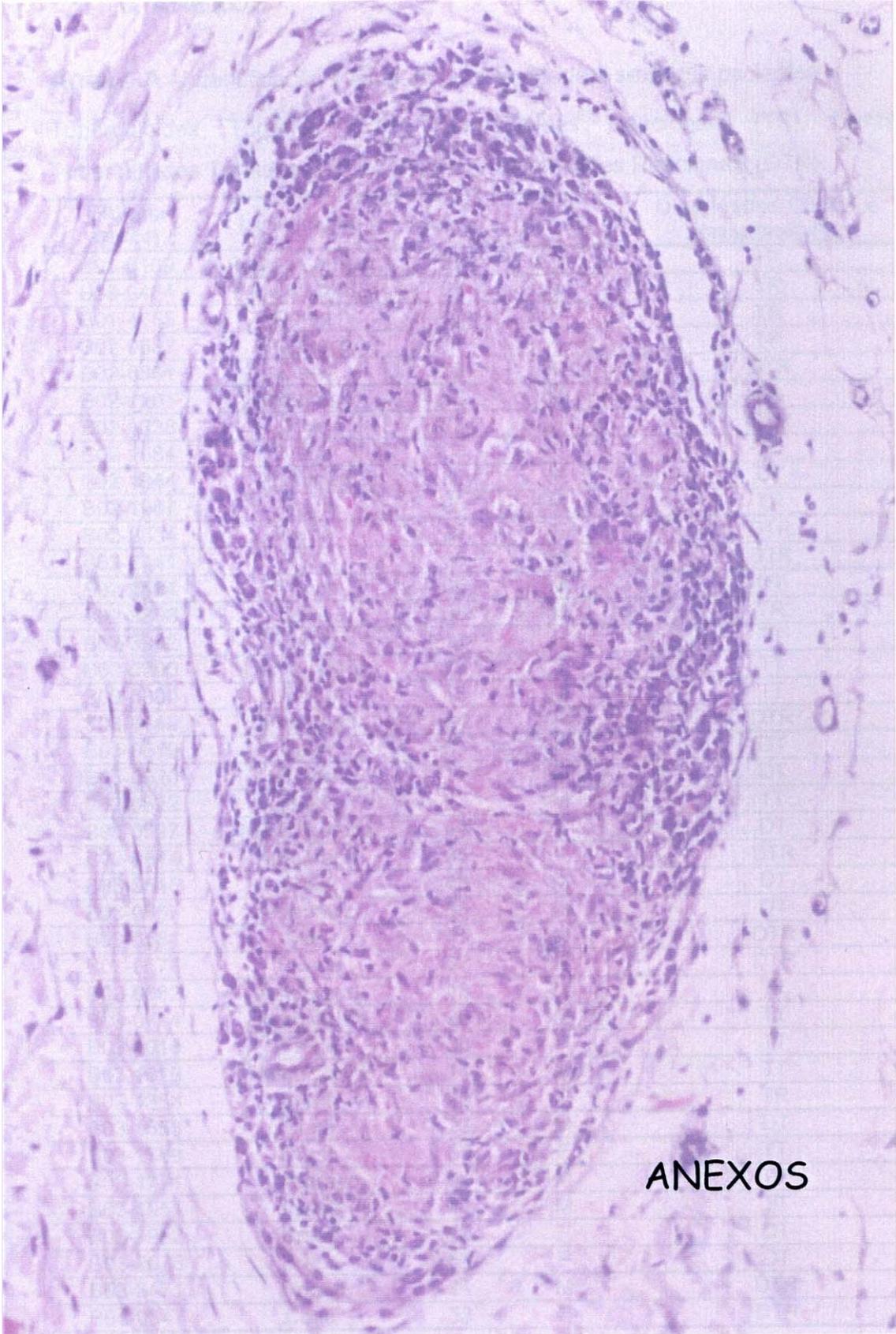


CONCLUSÕES

## 4. CONCLUSÕES

Diante dos resultados obtidos com a metodologia empregada e em confronto com os dados da literatura, pode-se concluir que:

1. A não-deteção de antígenos micobacterianos, em células epitelióides e células gigantes dos granulomas tuberculóides, sugere que na transformação epitelióide e na formação do granuloma tuberculóide já está implícito o efetivo processamento dos antígenos bacilares;
2. Há necessidade de uma avaliação crítica do modelo de distribuição de células participantes do processo imune nos granulomas tuberculóides, levando-se em conta a fase evolutiva do desenvolvimento do granuloma, eventuais equívocos de interpretação causados por justaposição de imagens, e a necessidade do conhecimento mais completo da exata expressão fenotípica e funcional das células referidas;
3. Os parâmetros que realmente sugerem maior capacidade imunecelular dos tuberculóides tórpidos sobre as outras manifestações foram: presença de células exterminadoras naturais (NK) e presença da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), além do "clearance" bacilar;
4. Na hanseníase, os comportamentos Th1, Th2 e Th3 não são excludentes entre si. A presença de linfócitos B e interleucina 10 (padrão Th2) em um contexto de reação Th1, nas manifestações tuberculóides, sugerem mecanismo de modulação para conter atividade altamente destrutiva para os tecidos;
5. Independentemente dos mecanismos imunológicos mais elaborados, a intensidade das reações imunecelulares e seu maior ou menor grau de hipersensibilidade vão depender da interação imunecelular *versus* carga bacilar, e isso pode criar situações paradoxais, nas quais um indivíduo da faixa tuberculóide sem resistência máxima pode desenvolver reações intensas e resolutivas.



ANEXOS

## 5. ANEXOS

### Anexo A - Identificação e local da biópsia, idade e sexo dos pacientes

Tuberculóides Tórpidos (TT), Tuberculóides Reacionais (TR), Dimorfo-Tuberculóides Tórpidos (DT) e Dimorfo-Tuberculóides Reacionais (DTR).

Biópsia (N=44)	Localização	Idade	Sexo	Diagnóstico Clínico e Histopatológico
B95-0169	Região Lombar	35	M	TR
B99-0464	Face e MMSS	63	M	TR
B01-4155	Dorso	47	F	TR
B02-0683	Antebraço	11	F	TR
B02-0861	Coxa	28	M	DTR
B02-1201	Antebraço	52	M	TR
B02-1338	Coxa	43	F	DTR
B02-1584	Braço	73	F	TR
B02-1944	Abdômen	31	M	DT
B02-1947	Braço	68	M	TR
B02-2354	Perna	29	F	DTR
B02-2441	MSD	56	M	DTR
B02-2534	Tronco	65	M	DT
B02-3398	Coxa	65	M	TR
B02-3992	Perna	17	F	TT
B03-0290	Dorso do Pé	13	F	TT
B03-0300	Joelho	15	M	TT
S03-0440	Antebraço	84	F	DTR
B03-0519	Coxa	65	F	DT
B03-0520	Braço	72	M	DT
B03-0522	Joelho	23	M	TT
B03-0527	Região Lombar	44	F	DT
B03-0544	Antebraço	35	F	DTR
B03-0546	Coxa	48	M	DT
B03-0557	Antebraço	35	M	DT
B03-0561	Mão	47	M	DTR
B03-0578	Tronco	62	F	DTR
B03-0682	Antebraço	18	M	TT
B03-0714	Dorso do Pé	25	M	TT
B03-1010	Perna	38	F	TT
B03-1019	Dorso do Pé	14	M	TT
B03-1358	Braço	29	F	TR
B03-1553	Coxa	23	M	DT
B03-1769	Dorso	35	F	TT
B03-1771	Antebraço	64	M	TR
B03-1951	Joelho	12	M	TT
B03-1952	Braço	39	F	DT
B03-2078	Braço	53	F	DT
B03-3471	Tronco	24	M	DTR
B04-0347	Coxa	53	F	DTR

## Anexo B - Análise semiquantitativa de antígenos micobacterianos.

Lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações tórpidas (TT e DT). Valores de 0 a 6+, segundo Ridley (1971).

Biópsia	Clinica	Baciloscopia	LAM	BCG
B02-3992	TT	0	1	1
B03-290	TT	1	1	1
B03-300	TT	1	1	1
B03-522	TT	0	1	1
B03-682	TT	0	0	0
B03-714	TT	0	0	0
B03-1010	TT	0	1	1
B03-1019	TT	1	1	1
B03-1769	TT	0	1	1
B03-1951	TT	0	0	0
Mediana		0	1	1
B03-1952	DT	2	2	2
B03-2078	DT	2	3	3
B02-1944	DT	2	2	2
B02-2534	DT	2	2	2
B03-519	DT	2	2	2
B03-520	DT	2	2	2
B03-527	DT	2	2	2
B03-546	DT	2	2	2
B03-557	DT	2	2	2
B03-1553	DT	3	3	3
Mediana		2	2	2
Mediana	TÓRPIDOS	2	2	2

Lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações reacionais (TR e DTR). Valores de 0 a 6+, segundo Ridley (1971)

Biópsia	Clinica	Baciloscopia	LAM	BCG
B95-169	TR	1	1	1
B99-464	TR	1	1	1
B01-4155	TR	1	1	1
B02-683	TR	0	1	1
B02-1201	TR	0	1	1
B02-1584	TR	0	1	1
B02-1947	TR	0	1	1
B02-3398	TR	1	1	1
B03-1358	TR	1	1	1
B03-1771	TR	1	1	1
Mediana		1	1	1
B02-861	DTR	2	2	2
B02-1338	DTR	3	4	4
B02-2354	DTR	2	2	2
B02-2441	DTR	5	5	5
S03-440	DTR	3	4	4
B03-544	DTR	2	2	2
B03-561	DTR	5	5	5
B03-578	DTR	3	3	3
B03-3471	DTR	4	4	5
B04-347	DTR	2	2	2
Mediana		3	3,50	3,50
Mediana	REACIONAIS	1,50	1,50	1,50

### Anexo C – Análise quantitativa de linfócitos T (CD4+ e CD8+).

Número total de linfócitos T/mm<sup>2</sup> distribuídos na derme superficial, média, profunda e total, e proporção CD4:CD8 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações tórpidas (TT e DT).

Biópsia	Clinica	CD4 DS	CD4 DM	CD4 DP	CD4 TOTAL	CD8 DS	CD8 DM	CD8 DP	CD8 DT	CD4:CD8
B02-3992	TT	665	783	647	2095	435	392	288	1115	1,88
B03-290	TT	350	663	888	1902	330	667	843	1840	1,03
B03-300	TT	638	942	335	1915	223	453	205	883	2,17
B03-522	TT	858	467	540	1895	403	158	190	775	2,45
B03-682	TT	388	437	738	1563	210	357	577	1143	1,37
B03-714	TT	483	557	678	1718	208	252	275	735	2,34
B03-1010	TT	225	645	453	1323	182	633	382	1197	1,11
B03-1019	TT	432	565	762	1758	303	395	412	1110	1,58
B03-1769	TT	560	207	65	911	567	188	60	894	1,02
B03-1951	TT	682	595	295	1572	540	475	235	1250	1,26
Média		528,14	585,99	540,15	1665,23	340,15	396,98	346,66	1094,21	1,52
± D.P.		± 188,24	± 199,08	± 252,86	± 345,06	± 140,94	± 170,33	± 224,3	± 317,87	
Mediana		521,65	580	593,33	1738,28	316,65	393,33	281,65	1112,48	1,56
B03-1952	DT	420	528	547	1495	302	283	415	1000	1,50
B03-2078	DT	587	667	537	1790	453	668	598	1720	1,04
B02-1944	DT	303	483	422	1207	195	177	350	722	1,67
B02-2534	DT	315	433	378	1127	172	330	188	690	1,63
B03-519	DT	313	375	520	1208	235	275	435	945	1,28
B03-520	DT	382	267	255	903	262	213	287	762	1,19
B03-527	DT	297	125	245	647	313	157	160	673	0,96
B03-546	DT	598	542	450	1590	302	350	265	917	1,73
B03-557	DT	175	565	400	1133	140	495	648	1200	0,94
B03-1553	DT	582	577	380	1538	260	290	233	783	1,96
Média		397,07	456,15	413,33	1263,90	263,32	323,82	357,9	941,07	1,34
± D.P.		± 146,58	± 162,14	± 106,30	± 343,9	± 88,58	± 154,80	± 166,10	± 319,37	
Mediana		348,33	505,80	410,83	1207,80	260,83	286,65	318,33	849,98	1,42
Média	TÓRPIDAS	462,60	521,07	476,74	1464,56	301,74	360,40	352,28	1017,64	1,44
± D.P.		± 177,43	± 188,85	± 199,68	± 393,45	± 121,16	± 162,80	± 192,18	± 319,92	
Mediana	TÓRPIDAS	425,83	549,15	451,65	1550,78	281,65	340,00	287,48	930,83	1,66

## ANEXOS

Número total de linfócitos T/mm<sup>2</sup> distribuídos na derme superficial, média, profunda e total, e proporção CD4:CD8 nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações reacionais (TR e DTR).

Biópsia	Clinica	CD4 DS	CD4 DM	CD4 DP	CD4 TOTAL	CD8 DS	CD8 DM	CD8 DP	CD8 TOTAL	CD4:CD8
B96-169	TR	647	522	433	1602	482	643	293	1418	1,13
B99-464	TR	557	628	585	1770	208	182	115	505	3,51
B01-4155	TR	552	623	630	1805	87	82	108	277	6,53
B02-683	TR	307	353	263	923	273	317	498	1088	0,85
B02-1201	TR	293	178	182	653	422	583	625	1629	0,40
B02-1584	TR	563	535	257	1355	295	312	200	807	1,68
B02-1947	TR	392	272	513	1177	318	272	402	992	1,19
B02-3398	TR	595	590	563	1748	252	278	190	720	2,43
B03-1358	TR	500	787	695	1982	258	390	402	1050	1,89
B03-1771	TR	642	680	668	1990	332	330	380	1042	1,91
Média		504,65	516,82	478,98	1500,44	292,65	338,82	321,32	952,68	1,57
± D.P.		± 130,01	± 191,59	± 185,98	± 457,66	± 109,21	± 168,46	± 170,16	± 400,63	
Mediana		554,15	562,50	538,30	1674,9	284,15	314,15	336,65	1016,83	1,64
B02-861	DTR	405	420	395	1220	293	215	233	742	1,65
B02-1338	DTR	388	423	510	1322	383	368	443	1195	1,11
B02-2354	DTR	657	465	365	1487	368	317	285	970	1,53
B02-2441	DTR	487	437	490	1413	357	320	255	932	1,52
S03-440	DTR	577	542	800	1918	278	405	375	1058	1,81
B03-544	DTR	313	192	168	672	283	187	175	645	1,04
B03-561	DTR	392	500	467	1358	328	333	490	1152	1,18
B03-578	DTR	405	525	595	1525	395	502	532	1428	1,07
B03-3471	DTR	278	168	250	697	472	223	343	1038	0,67
B04-347	DTR	423	342	522	1287	297	247	415	958	1,34
Média		432,47	401,32	456,16	1289,81	345,48	311,65	354,66	1011,77	1,27
± D.P.		± 114,10	± 130,25	± 177,44	± 372,43	± 61,67	± 97,52	± 117,13	± 223,11	
Mediana		405	429,98	478,33	1339,95	342,48	318,33	359,15	1004,10	1,33
Média	REACIONAIS	468,56	459,07	467,57	1395,12	319,06	325,23	337,99	982,22	1,42
± D.P.		± 124,68	± 170,10	± 177,30	± 420,23	± 90,47	± 134,69	± 143,20	± 317,06	
Mediana	REACIONAIS	454,98	482,50	500,00	1385,78	307,48	316,65	359,15	1014,98	1,36

**Anexo D - Análise semiquantitativa de linfócitos B (CD20+ e CD79a+)**

Distribuição dos linfócitos CD20+ e CD79+ na derme superficial, média, profunda e total em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações tórpidas (TT e DT). Valores expressos em + (Escala de 0-4).

Biópsia	Clínica	CD2 DS	CD20 DM	CD20 DP	CD20 Total	CD79 DS	CD79 DM	CD79 DP	CD79a Total
B02-3992	TT	2	2	3	2	2	2	3	2
B03-290	TT	2	2	3	2	1	1	2	1
B03-300	TT	1	2	2	2	1	1	2	1
B03-522	TT	1	1	1	1	1	1	1	1
B03-682	TT	2	3	4	3	1	2	3	2
B03-714	TT	1	2	1	1	1	1	1	1
B03-1010	TT	1	2	3	2	0	1	2	1
B03-1019	TT	2	2	2	2	0	0	1	1
B03-1769	TT	1	1	1	1	0	0	1	1
B03-1951	TT	2	3	3	3	1	2	2	2
Mediana		1,50	2	2,50	2	1	1	2	1
B03-1952	DT	1	2	3	2	1	2	2	2
B03-2078	DT	2	3	4	3	1	2	3	2
B02-1944	DT	1	2	3	2	1	2	2	2
B02-2534	DT	2	2	2	2	2	2	2	2
B03-519	DT	1	2	2	2	1	1	1	1
B03-520	DT	2	3	3	3	1	2	1	1
B03-527	DT	2	2	2	2	1	1	0	1
B03-546	DT	3	3	3	3	1	1	2	1
B03-557	DT	1	3	4	3	0	1	2	1
B03-1553	DT	2	3	2	2	1	2	2	2
Mediana		2	2,50	3	2	1	2	2	1,50
Mediana TÓRPIDAS		2	2	3	2	1	1	2	1

Distribuição dos linfócitos CD20+ e CD79a+ na derme superficial, média, profunda e total em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações reacionais (TR e DTR). Valores expressos em + (Escala de 0-4).

Biópsia	Clinica	CD20 DS	CD20 DM	CD20 DP	CD20 TOTAL	CD79 DS	CD79 DM	CD79 DP	CD79a TOTAL
B95-169	TR	2	3	3	3	2	3	2	2
B99-464	TR	1	2	2	2	1	2	2	2
B01-4155	TR	1	2	2	2	1	2	2	2
B02-683	TR	2	3	3	3	2	3	3	3
B02-1201	TR	1	2	2	2	1	2	2	2
B02-1584	TR	2	3	4	3	2	3	4	3
B02-1947	TR	2	3	4	3	2	3	3	3
B02-3398	TR	2	3	3	3	2	2	3	2
B03-1358	TR	2	3	4	3	2	3	4	3
B03-1771	TR	1	2	3	2	1	2	2	2
Mediana		2	3	3	3	2	2,50	2,50	2
B02-861	DTR	2	3	4	3	2	3	4	3
B02-1338	DTR	3	3	3	3	2	3	3	3
B02-2354	DTR	3	3	4	3	3	3	4	3
B02-2441	DTR	2	3	3	3	2	3	3	3
S03-440	DTR	2	3	3	3	2	3	3	3
B03-544	DTR	2	2	3	2	1	1	2	1
B03-561	DTR	2	3	3	3	1	2	2	2
B03-578	DTR	2	3	3	3	1	2	2	2
B03-3471	DTR	1	1	3	2	1	1	3	2
B04-347	DTR	1	2	3	2	1	2	2	2
Mediana		2	3	3	3	1,50	2,50	3	2,50
Mediana REACIONAIS		2	3	3	3	2	2,50	3	2

**Anexo E - Análise quantitativa de células NK (CD57+).**

Número total de células NK+/mm<sup>2</sup> distribuídas na derme superficial, média, profunda e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações tórpidas (TT e DT).

<b>Biópsia</b>	<b>Clinica</b>	<b>NK DS</b>	<b>NK DM</b>	<b>NK DP</b>	<b>NK TOTAL</b>
602-3992	TT	121	196	394	711
B03-290	TT	60	94	77	231
B03-300	TT	103	279	76	458
B03-522	TT	285	99	83	466
B03-682	TT	118	166	262	546
803-714	TT	105	108	75	288
B03-1010	TT	64	106	97	267
B03-1019	TT	25	32	32	89
B03-1769	TT	249	228	123	600
B03-1951	TT	182	151	138	471
Média		131,20	145,80	135,60	412,60
± D.P.		± 83,49	± 73,22	± 109,85	± 189,87
Mediana		111,50	129,50	89,75	462,00
B03-1952	DT	131	167	127	425
B03-2078	DT	328	305	228	861
602-1944	DT	6	18	3	27
B02-2534	DT	58	51	32	141
B03-519	DT	24	38	15	77
B03-520	DT	64	60	53	177
B03-527	DT	78	65	38	181
B03-546	DT	101	92	47	240
B03-557	DT	78	113	81	272
B03-1553	DT	138	124	103	365
Média		100,60	103,30	72,45	276,35
± D.P.		± 90,08	± 83,67	± 66,80	± 238,61
Mediana		78	78,50	49,75	210,25
Média	TÓRPIDAS	115,90	124,55	104,03	344,48
± D.P.		± 85,98	± 79,57	± 94,23	± 221,20
Mediana	TÓRPIDAS	102	107	79	280

Número total de células NK+/mm<sup>2</sup> distribuídas na derme superficial, média, profunda e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações reacionais (TR e DTR).

<b>Biópsia</b>	<b>Clinica</b>	<b>NK DS</b>	<b>NK DWI</b>	<b>NK DP</b>	<b>NK TOTAL</b>
B99-464	TR	95	49	66	210
B01-4155	TR	172	176	77	425
B02-683	TR	57	62	97	216
B02-1201	TR	4	7	5	16
B02-1584	TR	30	25	26	81
B02-1947	TR	53	46	29	128
B02-3398	TR	59	33	47	139
B03-1358	TR	37	28	32	97
B03-1771	TR	30	30	26	86
Média		63,80	51	46,30	161,10
± D. P.		± 48,11	± 46,77	± 28,03	± 113,80
Mediana		55	39,50	39,50	133,50
B02-861	DTR	7	11	6	24
B02-1338	DTR	20	25	28	73
B02-2354	DTR	20	37	22	79
B02-2441	DTR	39	18	29	86
S03-440	DTR	47	41	34	122
B03-544	DTR	37	34	24	95
B03-561	DTR	99	77	138	314
B03-578	DTR	38	52	57	147
B03-3471	DTR	9	6	5	20
B04-347	DTR	155	112	110	377
Média		47,10	41,30	45,30	133,70
± D. P.		± 46,09	± 32,37	± 44,44	± 118,99
Mediana		37,50	35,50	28,50	90,50
Média	REACIONAIS	55,45	46,15	45,80	147,40
± D. P.		± 46,64	± 39,47	± 36,17	± 114,19
Mediana	REACIONAIS	38,50	35,50	30,50	109,50

**Anexo F** - Análise quantitativa de células expressando IL-10.

Número total de células IL10+/mm<sup>2</sup> distribuídas na derme superficial, média, profunda e total nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações tórpidas (TT e DT).

Biópsia	Clinica	IL-10 DS	IL-10 DM	IL-10 DP	IL-10 TOTAL
<b>B02-3992</b>	<b>TT</b>	<b>20</b>	<b>29</b>	<b>22</b>	<b>71</b>
<b>B03-290</b>	<b>TT</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>5</b>
<b>B03-300</b>	<b>TT</b>	11	16	5	32
B03-522	TT	7	1	0	8
B03-682	TT	15	10	1	26
B03-714	TT	17	5	8	30
B03-1010	TT	2	1	1	5
B03-1019	TT	9	23	13	45
B03-1769	TT	3	2	3	7
B03-1951	TT	7	5	1	13
Média		9,20	9,35	5,55	24,11
± D.P.		± 6,51	± 10,06	± 7,05	± 21,51
Mediana		8	5	2,25	19,43
B03-1952	DT	4	5	0	9
B03-2078	DT	1	0	1	2
B02-1944	DT				
B02-2534	DT	71	43	26	140
B03-519	DT	3	1	0	3
B03-520	DT	3	1	1	5
B03-527	DT	28	8	3	38
B03-546	DT	10	9	1	20
B03-557	DT	2	5	1	6
B03-1553	DT	26	24	15	65
Média		16,46	10,56	5,28	31,97
± D.P.		± 22,96	± 14,17	± 9,09	± 45,55
Mediana		4	5	1	9
Média	<b>TÓRPIDAS</b>	12,64	9,92	5,42	27,83
±D.P.		±16,41	±11,84	±7,85	±34,20
Mediana	<b>TÓRPIDAS</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>12,90</b>

Número total de células IL10+/mm<sup>2</sup> distribuídas na derme superficial, média, profunda e total nas lesões cutâneas de pacientes com Hanseníase apresentando manifestações reacionais (TR e DTR).

Biópsia	Clínica	IL-10 DS	IL-10 DM	IL-10 DP	IL-10TOTAL
B95-169	TR	11	4	5	20
B99-464	TR	48	37	57	142
B01-4155	TR				
B02-683	TR	37	25	23	86
B02-1201	TR	19	35	19	73
B02-1584	TR	11	35	17	63
B02-1947	TR	15	8	7	30
B02-3398	TR	59	44	25	128
B03-1358	TR	87	80	45	212
B03-1771	TR	5	2	2	9
Média		32,44	29,94	22,22	84,73
± D.P.		± 27,62	± 24,47	± 18,41	± 66,07
Mediana		19	35	19	72,90
B02-861	DTR	49	42	16	107
B02-1338	DTR	7	9	7	23
B02-2354	DTR	52	26	41	119
B02-2441	DTR	30	34	17	81
S03-440	DTR	5	5	5	15
B03-544	DTR	26	11	5	42
B03-561	DTR	2	7	7	16
B03-578	DTR	63	75	30	168
B03-3471	DTR				
B04-347	DTR				
Média		29,25	26,13	16	71,34
± D.P.		± 23,55	± 24,01	± 13,23	± 56,60
Mediana		28	18,50	11,50	61,50
Média	REACIONAIS	30,94	28,15	19,29	78,43
± D.P.	REACIONAIS	± 25,04	± 23,57	± 16,01	± 60,26
Mediana	REACIONAIS	26	26	17	72,90

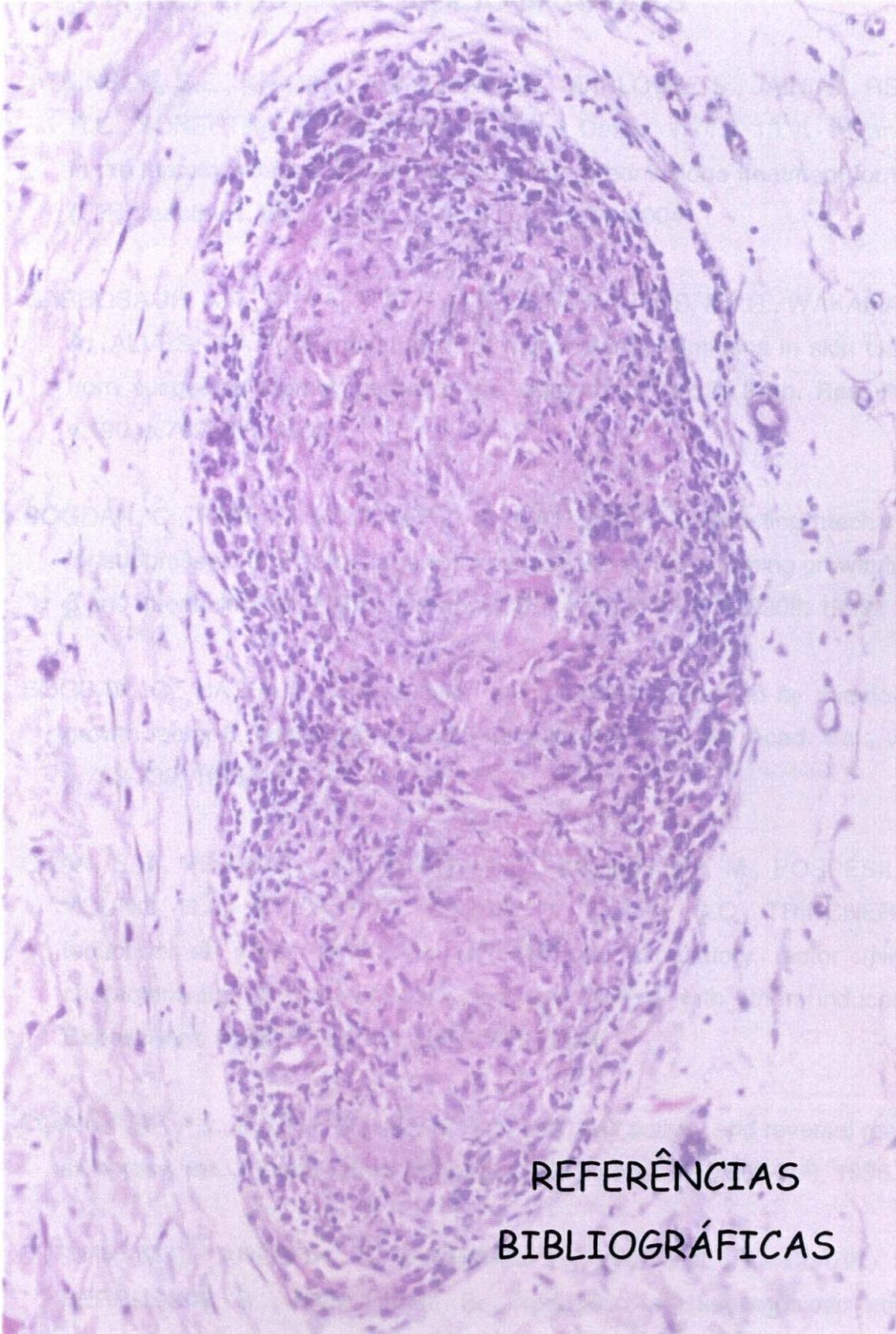
## Anexo G - Análise semiquantitativa de células expressando iNOS.

Lesões cutâneas de pacientes com hanseníase apresentando manifestações tórpidas (TT e DT).

<b>Biópsia</b>	<b>Clinica</b>	<b>INOS DS</b>	<b>INOS DM</b>	<b>INOS DP</b>	<b>INOS TOTAL</b>
B02-3992	TT	2	2	2	2
B03-290	TT	2	2	2	2
B03-300	TT	3	3	3	3
B03-522	TT	3	3	3	3
B03-682	TT	1	2	2	2
B03-714	TT	3	3	3	3
B03-1010	TT	1	2	2	2
B03-1019	TT	2	3	3	3
B03-1769	TT	3	3	2	3
B03-1951	TT	3	3	3	3
Mediana		2,50	3	2,50	3
B03-1952	DT	2	2	2	2
B03-2078	DT	2	2	2	2
B02-1944	DT				
B02-2534	DT	2	2	1	2
B03-519	DT	1	1	1	1
B03-520	DT	2	1	2	2
B03-527	DT	3	3	2	3
B03-546	DT	3	3	2	3
B03-557	DT	2	1	1	1
B03-1553	DT	2	2	2	2
Mediana		2	2	2	2
Mediana	TÓRPIDAS	2	2	2	2

Lesões cutâneas de pacientes com Hanseníase apresentando manifestações reacionais (TR e DTR).

Biópsia	Clínica	INOS DS	INOS DM	INOS DP	INOS TOTAL
B95-169	TR	3	2	1	2
B99-464	TR	2	2	2	2
B01-4155	TR				
B02-683	TR	2	1	1	1
B02-1201	TR	1	1	1	1
B02-1584	TR	1	1	1	1
B02-1947	TR	2	2	1	2
B02-3398	TR	2	2	2	2
B03-1358	TR	2	1	1	1
B03-1771	TR	1	1	1	1
Mediana		2	1	1	1
B02-861	DTR	2	1	1	1
B02-1338	DTR	2	2	2	2
B02-2354	DTR	1	1	1	1
B02-2441	DTR	1	1	1	1
S03-440	DTR	3	3	3	3
B03-544	DTR	2	2	2	2
B03-561	DTR	1	1	1	1
B03-578	DTR	2	2	2	2
B03-3471	DTR				
B04-347	DTR				
Mediana		2	1,50	1,50	1,50
Mediana	REACIONAIS	2	1	1	1



REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS

---

---

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ATKINSON, S.E., KHANOLKAR-YOUNG, S., MARLOWE, S., JAIN, S., REDDY, R.G., SUNEETHA, S., LOCKWOOD, D.N.J. Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (T1 R) reactions. **Int. J. Lepr.**, v.72, n.1, p.27-34, 2004.
- BARBOSA JR, A.A., SILVA, T. C., PATEL, B.N., SANTOS, M.I.R., WAKAMATSU, A., ALVES, V.A.F. Demonstration of mycobacterial antigens in skin biopsies from suspected leprosy cases in the absence of bacilli. **Path. Res. Pratt.**, v.190, p.782-785, 1994.
- BOGDAN, C., PAIK, J., VODOVOTZ, Y., NATHAN, C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-0 and interieukin-10. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.32, p.23301-23308, 1992.
- BOGDAN, C., NATHAN, C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor-13, interleukin-4, and interleukin-10. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.685, p.713-739, 1993.
- CHAN, S.H., PERUSSIA, B., GUPTA, J.W., KOBAYASHI, M., POSPÉSIL, M., YOUNG, H.A., WOLF, S.F., YOUNA, D., CLARK, S.C., TRINCHERI, G. Induction of  $\gamma$ -IFN production by NK cell stimulatory factor (NKSF): characterization of the responder cells and synergy with others inducers. **J. Experiment. Med.**, v.173, n.4, p.869-879, 1991.
- CONVERSE, P.J., BJUNE, G. Natural killer (NK) cell activity and reversal reaction in leprosy. **Int. J. Lepr. Other Micobact. Dis.**, v.54, n.4, p.503-509, 1986.
- CUTURI, M.C., ANÉGON, I., SHERMAN, F., LOUDON, R., CLARK, S.C., PERRUSSIA, B., TRINCHIERI, B. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. **J. Experiment. Med.**, v.69, p.569-583, 1989.

- CUTURI, M.C., ANÉGON, I., SHERMAN, F., LOUDON, R., CLARK, S.C., PERRUSSIA, B., TRINCHIERI, B. Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J. Experiment. Med.*, v.69, p.569-583, 1989.
- DE LA BARRERA, S., FINIASZ, M., FINK, S., ILARREGUI, J., ALEMAN, M., OLIVARES, L, FRANCO, M.C., PIZZARIELLO, G., DEL CARMEL SASIAIN, M. NK cells modulate the cytotoxic activity generated by *Mycobacterium leprae-hsp65* in leprosy patients: role of IL-18 and IL-13. *Clin. Exp. Immunol.*, v.135, n.1, p.105-113, 2004.
- DEL PRETE, G., DE CARLI, M., ALMERIGOGNA, F., GIUDIZI, M.G., 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.*, v.150, n.2, p.353-360, 1993.
- DHARMENDRA. Classification of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**, 2<sup>nd</sup> ed., Churchill Livingstone, New York, pp.179-190, 1994.
- ERNST, W.A., THOMA-USZINSKI, S., TEITELBAUM, R., KO, C., HANSON, D.A., CLAYBERGER, C., KRENSKY, A.M., LEIPPE, M., BLOOM, B.R., GANZ, T., MODLIN, R.L. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J. Immunol.*, v.165, p.7102-7108, 2000.
- FACCHETTI, F., VERMI, W., FIORENTINI, S., CHILOSI, M., CARUSO, A., DUSE, M., NOTARANGELO, L.D., BADOLATO, R. Expression of inducible nitric oxide synthase in human granulomas and histiocytic reactions. *Am. J. Pathol.*, v.154, n.1, p.145-152, 1999.
- FAKHOURI, R., SOTTO, M.N., MANINI, M.I.P., MARGARIDO, L.C. Nodular leprosy of childhood and tuberculoid leprosy: a comparative, morphologic,

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- immunopathologic and quantitative study of skin tissue reaction. **Int. J. Lepr.**, v.71, n.3, p.218-226, 2003.
- FIORENTINO, D.F., BOND, M.W., MOSMANN, T.R. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokines production by Th1 clones. **J. Exp. Med.**, v.170, p.2081-2095, 1989.
- FIORENTINO, D.F., ZLOTNIK, A., MOSMANN, T.R., HOWARD, M., O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J. Immunol.** Baltimore, v. 147, n. 11, pp.3815-3822, 1991.
- FLEURY, R.N. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling — uma análise morfológica. **Hans. Int.**, vol. 14, n. 2, pp.101-106, 1989.
- FOX, S.W., CHOW, J.W. Nitric oxide synthase expression in bone cells. **Bone**, v.23, n.1, p.1-6, 1998.
- FUKUTOMI, Y., MATSUOKA, M., MINAGAWA, F., TORATANI, S., MCCORMICK, G., and KRAHENBUHL, J. IL-10 treatment of macrophages bolsters intracellular survival of mycobacterium leprae. **Int. J. Lepr.**, vol. 72, n. 1, pp.16-26, 2004.
- GARCIA, V.E., UYEMURA, K., SIELING, P.A., OCHOA, M.T., MORITA, C.T., OKAMURA, H., KURIMOTO, M., REA, T.H., MODLIN, R.L. IL-18 promotes type 1 cytokine production from NK cells and T cells in human intracellular infection. **J. Immunol.**, v.162, n.10, p.6114-6121, 1999.
- GALLINELLI, R.T., OSWALD, I.P., JAMES, S.L., SCHER, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN- $\gamma$ -activated macrophages. **J. Immunol.**, v.148, n.6, p.1792-1796, 1992.
- GOLDSBY, R.A., KINDT, T.J., OSBORNE, B.A. **Kuby Imunologia**, 48 ed. Rio de Janeiro:Revinter , 2002, p.239-267.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- GOULART, I.M.B. FIGUEIREDO, F., COIMBRA, T., FOSS, N.T. Detection of transforming growth factor-b1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. **Am. J. Pathol.**, v.148, p.911-917, 1996.
- HARBOE, M. Overview of host-parasite relations. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**, 2<sup>nd</sup>. ed New York:Churchill Livingstone, p.87-112, 1994.
- HUNTER, S.W., BRENNAN, P.J. A novel phenolic glycolipid from *Mycobacterium leprae* possibly involved in immunogenicity and pathogenicity. **J. Bacteriol.**, v.147, p.728-735, 1981.
- HUNTER, S.W., FUJIWARA, T., BRENNAN, P.J. Structure and antigenicity of the major specific antigen of *Mycobacterium leprae*. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p.15072-15078, 1982.
- JOB, C.K. Pathology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**, 2<sup>nd</sup>. ed. Churchill Livingstone:New York, p.193-224, 1994.
- JOPLING, W.H. Leprosy reactions (reactional states). In: **Handbook of leprosy**. 2. ed. William Heinemann Med. Books, p.66-74, 1978.
- KATO, H., SANADA, K., KOSEKI, M., OZAWA, T., Identification lymphocyte subpopulations in cutaneous lesions of leprosy. **Jpn. J. Leprosy**, v.52, p.126-132, 1983.
- KAUFMANN, S.H.E. Cell-mediated immunity. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**, 2<sup>nd</sup> ed. New York:Churchill Livingstone, 1994, p.157-168.
- KHANOLKAR-YOUNG, S., SNOWDON, D., LOCKWOOD, D.N.J. Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TFG-f3) in leprosy lesions. **Clin. Exp. Immunol.**, v.113, p.438-442, 1998.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- KIRCHHEIMER, W.F., STORRS, E.E. Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus* Linn.) as a model for the study of leprosy. **Int. J. Lepr.**, v.39, p.693-702, 1971.
- KRAHENBUHL, J.L., ADAMS, L.B. The role of the macrophage in resistance to the leprosy bacillus. **Immunol. Ser.**, v.60, p.281-302, 1994.
- KUTZNER, H., ARGENYI, LB., REQUENA, L., ROTTEN, A., HÜGEL, H. A new application of BCG antibody for rapid screening of various tissue microorganisms. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.38, n.1, p.56-60, 1998.
- LASTORIA, J.C., OPROMOLLA, D.V.A., FLEURY, R.N., HABERMANN, F., and CURT, P.R. Serial Mitsuda testes for identification of reactional borderline leprosy forms. **Int. J. Lepr.**, v.66, n.2, p.190-200, 1998
- LIEW, F.Y. The role of nitric oxide in parasitic disease. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.87, n.6, p.634-642, 1993.
- LITTLE, D., KHANOLKAR-YOUNG, S., COULTHART, A., SUNEETHA, S., LOCKWOOD, D.N.J. 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.**, v.69, n.5, p.3413-3417, 2001.
- LOCKWOOD, D.N.J., COLSTON, M.J., KHANOLKAR-YOUNG, S.R. 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.**, v.66, n.4, p.409-415, 2002.
- MEHRA, V., BRENNAN, P.J., RADA, E., CONVIT., J., BLOOM, B.R. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. **Nature**, v.308, p.194-196, 1984.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- MODLIN, R.L., HOFMAN, F.M., TAYLOR, C.R., REA, T.H. T lymphocyte subsets in the skin lesion of patients with leprosy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.8, p.182-189, 1983.
- MODLIN, R.L., MELANCON-KAPLAN, J., YOUNG, S.M.M., PIRMEZ, C., KING, H., CONVIT, J., REA, T.H., BLOOM, B.R. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.85, p.1213-1217, 1988.
- MODLIN, R.L., REA, T.H. Immunopathology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**, 2<sup>nd</sup>. ed. New York: Churchill Livingstone, 1994, p.225-234.
- MODLIN, R.L. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. **J. Invest. Dermatol.**, v.102, p.828-832, 1994.
- MODLIN, R.L. Learning from leprosy: insights into contemporary immunology from an ancient disease. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.**, v.15, p.1-6, 2002.
- MONCADA, S., PALMER, R.M., HIGGS, A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v.43, n.2, p.109-142, 1991.
- MONCADA, S., HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, v.329, n.27, p.2002-2012, 1993.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKY, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I - Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, n.7, p.2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T.R. 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.**, v.94, n. 14, p.110-115, 1991.

- NARAYANAN, R.B., BHUTANI, L.K., SHARMA, A.K., NATH, I. T cell subsets in leprosy lesions: *in situ* characterization using monoclonal antibodies. **Clin. Exp. Immunol.**, v.51, p.421-429, 1983.
- NARAYANAN, RB., GIRDHAR, B.K., MALAVIYA, G.N., SENGUPTA, U. *In situ* demonstration of *Mycobacterium leprae* antigens in leprosy lesions using monoclonal antibodies. **Immunology Lett.**, v.24, p.179-184, 1990.
- NATRAJAN, M., KATOCH, K., KATOCH, V.M. Histology and immuno-histology of lesions clinically suspicious of leprosy. **Acta Leprologica**, v.11, n.3, p.93-98, 1999.
- NEILL, M.A., KLEBANOFF, S.J. The effect of phenolic glycolipid-I from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. **J. Exp. Med.**, v.167, p.30-42, 1988.
- OLIVEIRA, S.H., FONSECA, S.G., ROMÃO, P.R., FIGUEIREDO, F., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.O. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. **Parasite Immunol.**, v.20, n.9, p.405-412, 1998.
- OPROMOLLA, D.V.A. and FLEURY, R.N. Classification of leprosy. In: LATAPI, F., ET AL., **Leprosy**. Proceedings of the XI International Leprosy Congress, Amsterdam: Excerpta Médica, p. 254-60, 1978.
- PAGLIARI, C., DUARTE, M.I.S., SOTTO, M.N. Pattern of mycobacterial antigen detection in leprosy. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v.37, n.1, p.7-12, 1995.
- PRASAD, H.K., MISHRA, R.S., NATH, I. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of *in vitro* concanavalin A responses unrelated to leprosy type. **J. Exp. Med.**, v.165, p.239-244, 1987.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- PAGLIARI, C., DUARTE, M.I.S., SOTTO, M.N. Pattern of mycobacterial antigen detection in leprosy. **Rev. Inst. Med. trop. São Paulo**, v.37, n.1, p.7-12, 1995.
- PRASAD, H.K., MISHRA, R.S., NATH, I. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of *in vitro* concanavalin A responses unrelated to leprosy type. **J. Exp. Med.**, v.165, p.239-244, 1987.
- RABELLO, F.E. Clinical aspects: The polar concept. In: LATAPI, F., et al. **Leprosy**. Proceedings of the XI International Leprosy Congress. Amsterdam: Excerpta Médica, 1978, p. 63-67.
- REES, R.J.W., YOUNG, D.B. The microbiology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**, 2<sup>ª</sup> ed. New York:Churchill Livingstone, p.49-83, 1994.
- RIDLEY, D.S., and JOPLING, W.H. A classification of leprosy for research purposes. **Lepr. Rev.**, v.33, p.119-128, 1962.
- RIDLEY, D.S., and JOPLING, W.H. Classification of leprosy according to immunity - a five - group system. **Int. J. Lepr.**, v.34, p.255-273,1966.
- RIDLEY, D.S. Skin biopsy in leprosy, 2<sup>ª</sup> ed. CIBA-GEIGY: Switzerland, 1987. 63p.
- ROMAGNANI, S. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the "natural" immune response? **Immunol. Today**, v.13, n.10, p.379-381, 1992.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Imunologia 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 1999, p.229-242, a.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Imunologia 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 1999, p.13-30, b.
- ROITT, I., BROSTOFF, J., MALE, D. Imunologia 5<sup>a</sup> ed. São Paulo: Manole, 1999, p.139-153, c.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ROSS, R., GILLITZER, C., KLEINZ, R., SCHWING, J., KLEINERT, H., FÓRSTERMANN, U., RESKE-KUNZ, A.B. Involvement of NO in contact hypersensitivity. **Int. Immunol.**, v.10, n.1, p.61-69,1998.
- SHEPARD, C.C., MCRAE, D.H. *Mycobacterium leprae* in mice: minimal infectious dose, relationship between staining quality and infectivity, and effect of cortisone. **J. Bacteriol.**, v.89, p.365-372, 1965.
- SCHETTINI, A.P.M., FERREIRA, L.C.L., MILAGROS, R., SCHETTINI, M.C.A., PENNINI, S.N., REBELLO, P.B. 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.**, v.69, n.4, p.335-340, 2001.
- SHETTY, V.P., UPLEKAR, M.W., ANITA, N.H. Immunohistological localization of mycobacterial antigens within the peripheral nerves of treated leprosy patients and their significance to nerve damage in leprosy. **Acta Neuropathol.**, v.88, p.300-306, 1994.
- SCHÖN, T., HERNANDEZ-PANDO, R.H., NEGESSE, Y., LEEKASSA, R., SUNDQVIST, T., BRITTON, S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. **British J. Dermatol.**, v.145, p.809-815, 2001.
- SIGNER, S.C., VAZQUEZ, M.A., LU, C.Y. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. **J. Immunol.**, v.153, n.3, p.1293-1300, 1994.
- SIELING, P.A., MODLIN, R.L. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. **Springer Semin Immunopathol.**, v.13, p.413-426, 1992.
- SIELING, P.A., ABRAMS, J.S., YAMAMURA, M., SALGAME, P., BLOOM, B.R., REA, T.H., MODLIN, R.L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. **J. Immunol.**, v.150, n.12, p.5501-5510, 1993.

- SIELING, P.A., MODLIN, R.L. T Cytokine patterns in leprosy. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.730, p.42-52, 1994.
- SILVA, C.L., FACCIOLI, L.H., FOSS, N.T. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr.**, v.61, n.1, p.107-108, 1993.
- SOUZA CAMPOS, N., RATH DE SOUZA, P. Reactional states in leprosy. **Int. J. Lepr.**, vol.22, p.259-273, 1954.
- SOUZA LIMA, L. & SOUZA CAMPOS, N.- Leprides tuberculóides reacionais. In: **Lepra tuberculóide: estudo clínico-histopatológico**. São Paulo, Renascença, 1947. p.173-215.
- TAGA, K., TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-12 production. **J. Immunol.**, v.148, n.4, p.1143-1148, 1992.
- TAKASHASHI, M.D., ANRADE Jr., H.F., 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.**, v.59, n.1, p.1991
- TAYLOR-ROBINSON, A.W., LIEW, F.Y., SEVERN, A., XU, D., MCSORLEY, S.J., GARSIDE, P., PADRON, J., PHILIPS, R.S. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. **Eur. J. Immunol.**, v.24, n.4, p.980-984, 1994.
- TRINCHERI, G., MATSUMOTO-KOBAYASHI, M., CLARK, S.C., SHEERA, J., LONDON, L., PERRUSSIA, B. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin-2. **J. Experiment. Med.**, v. 60, p.1147-1169, 1984.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- VACHULA, M., WOROBEK, S., ANDERSEN, B.R. A comparison of monocyte oxidative responses in leprosy patients and healthy subjects as influenced by mycobacterial lipid treatment. **Int. J. Lepr.**, v.58, p.534-539, 1990.
- VAN DEN BOS, I.C., KHANOLKAR-YOUNG, S., DAS, P.K., LOCKWOOD, D.N.J. Immunohistochemical detection of PGL-1, LAM, 30kD and 65 kD antigens in leprosy infected paraffin preserved skin and nerve sections. **Lepr. Rev.**, v.70, p.272-280, 1999.
- VERHAGEN, C.E, WIERENGA, E.A., BUFFING, A., FABER, W., KLASTER, P., NAAFS, B., DAS, P.K. 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.**, v.159, p.1470-1475, 1997.
- VERHAGEN, C.E., FABER, W., KLASTSER, P., BUFFING, A., NAAFS, B., DAS, P. 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.**, v.154, p.1793-1804, 1999.
- WADE, H.W. Tuberculoid changes in leprosy: II lepra reaction in tuberculoid leprosy. **Int. J. Leprosy**, v.2, p.279-292, 1934.
- WANG, T., IZUMI, S., BUTT, K.I., KAWATSU, K., MAEDA, Y. Demonstration of PGL-1 and LAMB antigens in paraffin sections of leprosy skin lesions. **Jpn. J. Leprosy**, v.61, p.161-174, 1992.
- WEISS, E., MAMELAK, A.J., LA MORGIA, S., WANG, B., FELICIANI, C., TULLI, A., SAUDER, D.N. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.50, p.657-675, 2004.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

YAMAMURA, M., UYEMURA, K., DEANS, R.J., WEINBERG, K., REA T.H., BLOOM, B.R., MODLIN, R.L. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. **Science**, v.254, n.5029, p.277-279, 1991.

YAMAMURA, M., WANG, X-H., OHMEN, J.D., UYEMURA, K., REA, T.H., BLOOM, B.R., MODLIN, R.I. Cytokine patterns of immunologically mediated tissue damage. **J. Immunology**, v.149, n.4, p.1470-1475, 1992.