



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 epiteloides 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 epiteloides, 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- γ), bloqueia a indução e a liberação do fator de necrose tumoral (TNF- α) 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⁻ e CD8⁻ (duplo negativos), mas a maioria geralmente apresenta receptores CD8⁺ 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 γ sob ação da IL-12 secretada por macrófagos infectados, estimulando a destruição intrafagolisossomal (Modlin, 1994; Garcia et al., 1999). Estas células são linfócitos morfológicamente 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 γ , 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 γ , TNF α , 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 γ 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 IFNY.

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+1CD28- (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+ justapostos aos macrófagos no centro da lesão, e com muitas células CD8+ restritas ao manguito que contorna o granuloma. Modlin et al (1988)

referiram que as células CD4+, presentes no centro do granuloma, são linfócitos T de memória, sendo que as células T-naive estavam localizadas no manguito linfocitário em volta do granuloma, perto das células CD8+, que são predominantemente CD28+ (citotóxicas). 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⁺ 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 γ , chamadas Th1, aumentam a imunidade mediada por células. O IFN γ ativa macrófagos e a IL-2 estimula o crescimento de células T antígeno-específicas, resultando em doença mais controlada ou cura. Linfócitos T, que produzem as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10 geram a resposta tipo Th2, que (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 imunoistoquímicos, 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 γ e TNF- α), 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⁺ Th2 capaz de suprimir a produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ 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 α , 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 γ por linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e por células NK. Essa inibição da função dos linfócitos Th1 parece ser devida à sua ação por meio de células acessórias agindo nos macrófagos, dependente ou independentemente da interação com moléculas de classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC-II) (Fiorentino et al., 1991; Bogdan, 1992). Além disso, suprime a produção de citocinas pelos macrófagos ativados (TNF α , IL-1, IL-6, IL-12) e a capacidade microbicida dessas células por inibição da expressão do receptor co-estimulador 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 γ (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 γ 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⁺ 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⁺ da resposta Th3, ou reguladora, presente em qualquer tipo de resposta adaptativa (Weiss et al 2004). A IL-10 e o IFN γ são citocinas antagônicas não só na função, como também na produção, uma vez que o IFN γ inibe a produção de IL-10 por monócitos. Apesar de ter as funções de inibir a imunidade celular, estimular a imunidade humoral, ou regular os dois tipos de resposta adaptativa, a IL-10 estimula a citotoxicidade mediada por células e a imunidade inata, pois aumenta a proliferação de mastócitos, a fagocitose e a produção de citocinas pelas células NK induzida por IL-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 α e IFN γ . Esses dados indicam que o *M. leprae* induz a produção de IL-10 pelos macrófagos, a qual inibe a proliferação de linfócitos T CD4 Th1 (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_2 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- α , TNF- β , IFN- γ . Em contrapartida, as citocinas IL-10, IL-4 e o fator transformador do crescimento 6 (TGF-6) 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+ e sua participação na modulação da resposta

imune celular permanecem controversas. Estudo *in vitro* demonstrou produção de NO por células Th1, mas não por células Th2. Além disso, o NO inibiu a secreção de IL-2 e IFN- γ e não causou nenhum efeito na produção de IL-4 por células Th2. De acordo com Taylor-Robinson et al. (1994), o NO produzido por células Th1 participa de um mecanismo de **feed-back** negativo inibindo a produção de IL-2 e IFN- γ , 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- β nas formas da hanseníase, Khanolkar et al. (1998) evidenciaram forte marcação de iNOS nos pacientes TT, moderada positividade nas manifestações dimorfas com reação reversa (DT-RR e DL-RR) e ausência de reatividade nos DT e VV. A positividade para TGF- β 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- β . O TGF- β também foi negativo dentro dos granulomas reacionais, porém em dois casos foi positivo no perineuro, sugerindo produção pelas células perineurais, como forma de defesa, já que essa citocina inibe a produção de NO. Por outro lado, a produção de TGF- β 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- γ (Modlin et al.,1988). A expressão de mRNA para IL- β , TNF- α , IL-2, INF- γ 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 γ e TNF α), 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- γ 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.