

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^{1*}., Marques, M. E. A²., Fleury, R. N³., Barreto, J. A⁴., Soares, C. T⁵., Vilani-Moreno, F. R⁶., Naafs, B⁷., Das, P. K⁸.

*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".

¹ Equipe Técnica de Patologia, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

² Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina-UNESP. Botucatu, SP. Brasil.

³ Pesquisador Emérito, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

⁴ Seção de Anatomia Patológica, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

⁵ Seção de Anatomia Patológica, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

⁶ Equipe Técnica de Imunologia, Instituto Lauro de Souza Lima. Bauru, SP. Brasil.

⁷ Department of Dermatology, Leiden University Medical Centre, The Netherlands.

⁸ 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^{26,27}, 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 preexistentes³². 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 Jopling¹⁴. Na faixa de menor resistência do espectro, ou faixa virchoviana, há episódios agudos caracterizados por dilatação vascular e exsudação serofibrinoneutrofílica sobre granulomas macrofágicos regressivos, por vezes incluindo trombozes vasculares, abscedação, vasculites e necrose, definidos como reação tipo 2 de Jopling, ou eritema nodoso hansênico¹³. 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 dimorfo³. 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^{3,39}. Na classificação de Ridley e Jopling^{26,27}, os TR não são reconhecidos e, provavelmente, foram incluídos no grupo dimorfo. Mais tarde, no entanto, Ridley²⁸ 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 al¹⁷ 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 γ (interferon gama), que induz a ativação macrofágica, com produção de TNFa^{92,23}, citocinas que, juntas,

estimulam a produção de óxido nítrico sintase induzível (iNOS)^{16,18,29}. 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^{22,31,34}

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-10¹⁴⁰

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 modificações¹²⁰. 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+²¹.

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)³ e que foram usados no trabalho de Lastória et al.¹⁷

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)²⁸.

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*⁶.

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.¹², 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)¹¹, 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 0,0625mm², 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)³. 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 e	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 e	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 e	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 e	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 e	647,1 - 2094,9	672,75 - 1839,9	27,0 - 861,00	1,95 - 139,95	1 - 3	1 - 3
Reacion al	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 e	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/mm².

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

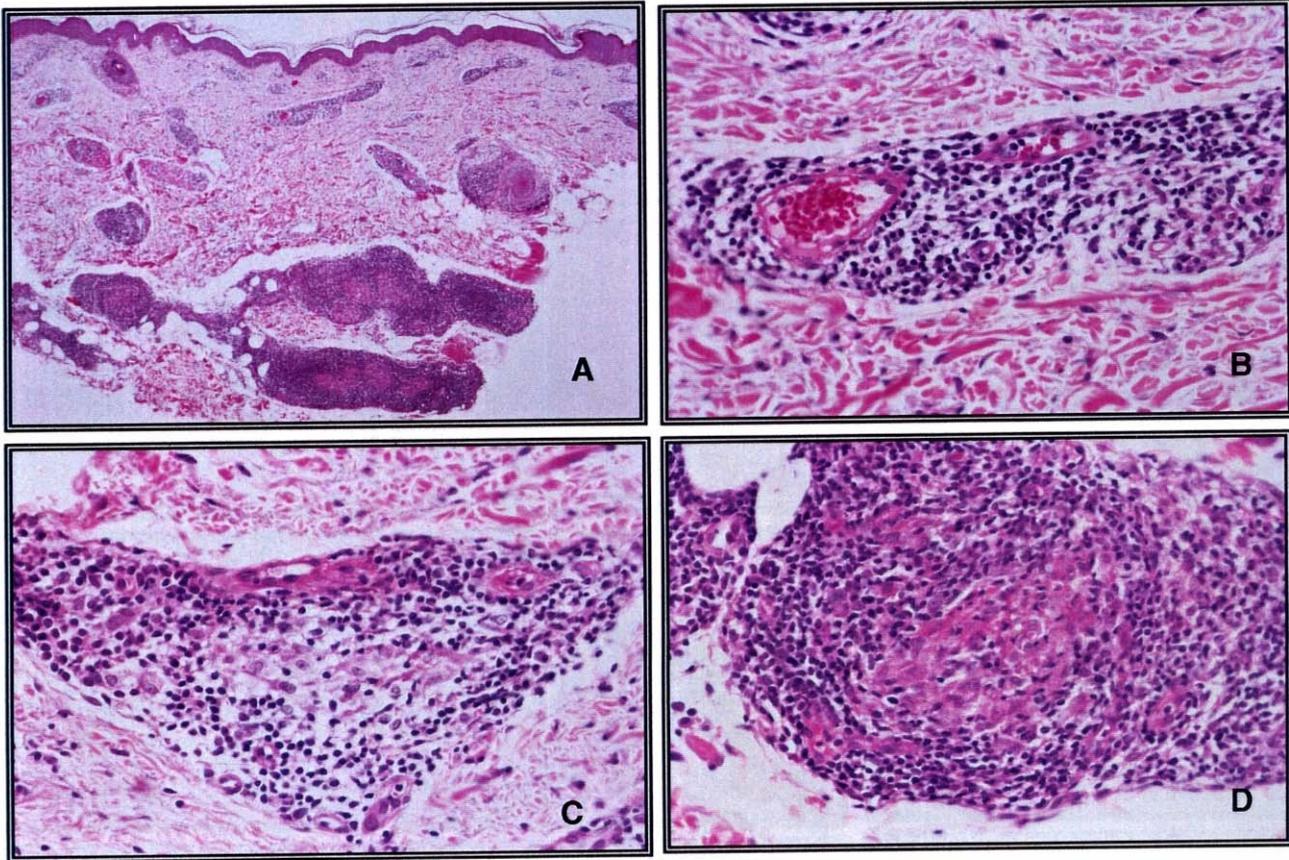


Figura 1: Hanseníase dimorfa-tuberculóide. Etapas na formação do granuloma. A: granulomas extensos, cordonais e granulomas focais no derma superficial e profundo (HE-50X). B: foco inflamatório superficial mostrando a relação dos linfócitos com vasos de pequeno calibre. Canto inferior direito: início 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).

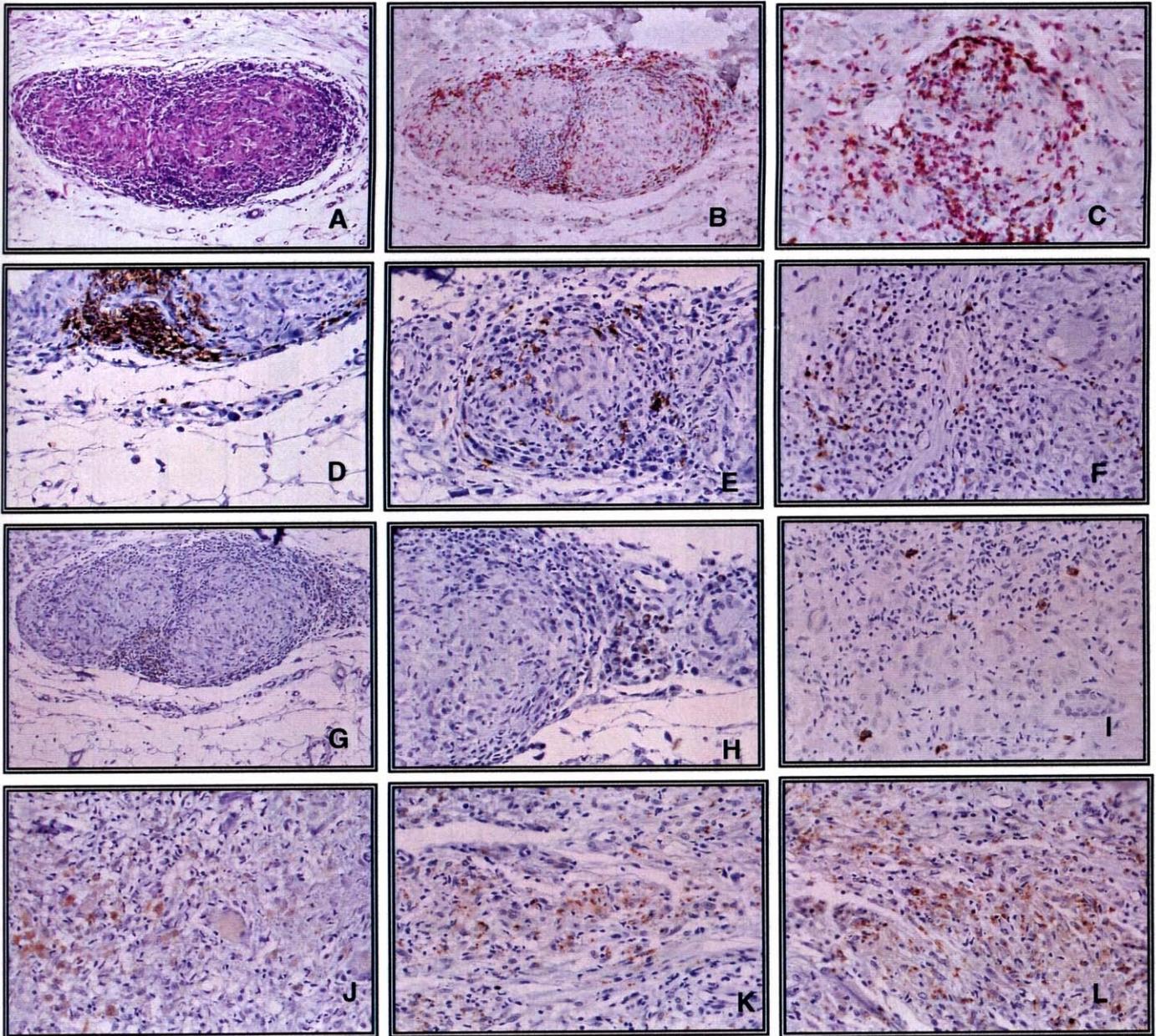
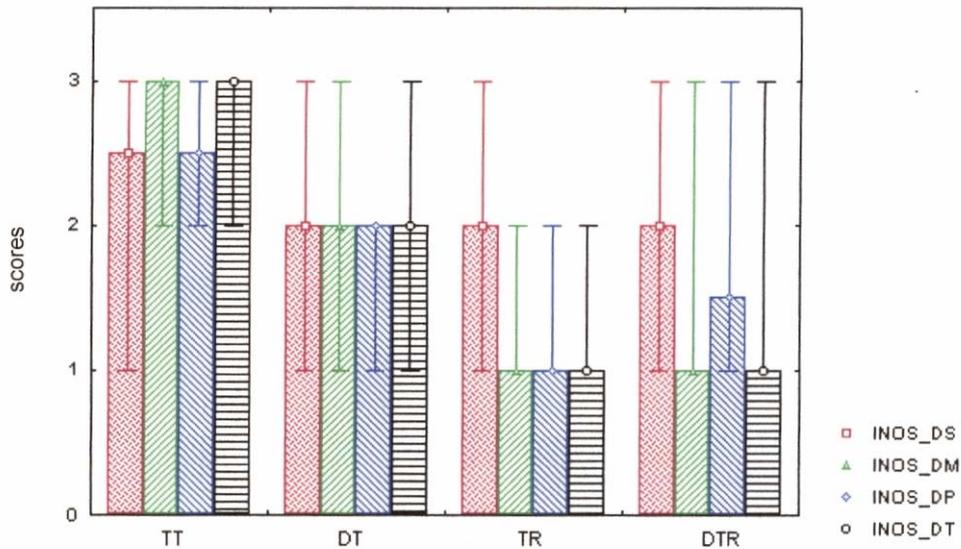


Figura 2: Hanseníase na faixa tuberculóide. Avaliação por imunistoquímica da população celular e células expressando IL-10 e iNOS. **A:** granuloma TR. (HE-100X); **B:** granuloma TR - dupla coloração com linfócitos CD4 (vermelho) e CD8 (marrom) no halo linfocitário e esparsos linfócitos no interior 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).

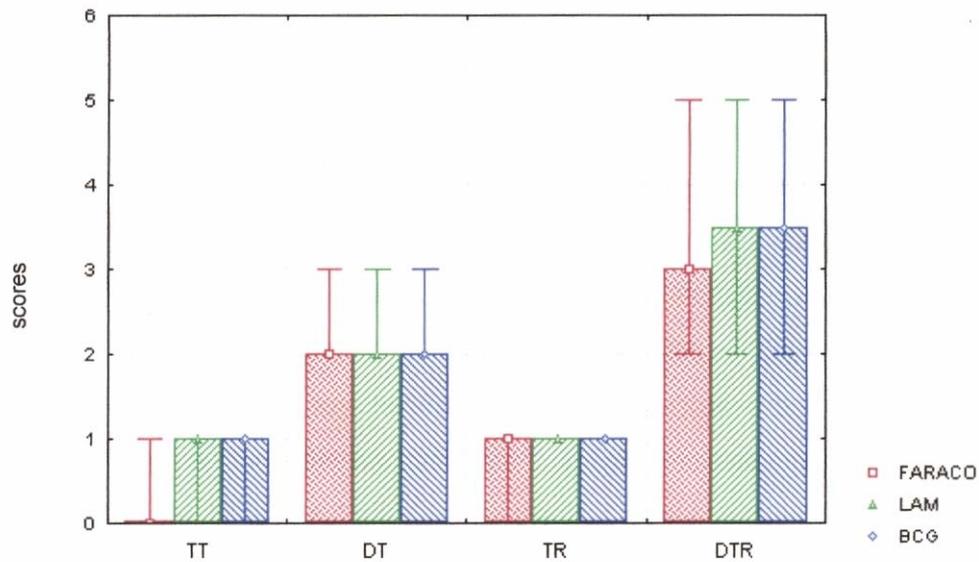
Figura 3. Avaliação semiquantitativa, por meio de técnica imunoistoquímica, de células expressando iNOS, na derme superficial, média, profunda e total, em biópsias de lesões cutâneas, em indivíduos classificados em 4 diferentes grupos na faixa tuberculóide do espectro da hanseníase.



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.



- a. Escala de 0 a 6+, de acordo com Ridley (1971).
- b. 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^{10,26,27,37} Quando Ridley sugere que os TT secundários derivam de retardo no reconhecimento antigênico²⁸, 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 bacilos³⁸. 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^{2,5, 19, 24,30,35}. Como na faixa virchoviana do espectro (VV e DV) os antígenos, não morfologicamente 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)⁶.

Modlin refere um padrão de distribuição linfocitária nos granulomas TT, o qual vem sendo repetido na maioria dos trabalhos sobre a imunopatologia da hanseníase²⁰. 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+^{5,21,31,3e}. 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 tuberculóides²¹, 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)⁵, 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^{16,18,29}. 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 γ e IL-12¹⁸. 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 iNOS⁸. 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 desregulada¹⁸.

A presença de IL-10 em todas as manifestações estudadas está de acordo com a literatura^{1,22,31,41}. 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^{1,40}.

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 citocinas²⁸, como IFN γ e TNF α ⁵, 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^{4,7}, e por IFN γ e IL-2 produzidos pelo granuloma tuberculóide. Estas citocinas aumentam a atividade citotóxica das células NK e induzem a produção de IFN γ , 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 γ 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*²⁸. 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 reacionais²⁵.

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 dimorfo-tuberculoïdes) s'identifient des manifestations chroniques, d'évolution lente et progressive, ou, tuberculoïde (torpido) (TT) et dimorfo-tuberculoïde (DT) et manifestations "ab initio" réactives, d'installation subite, avec lésions multiples, généralisées montrant une intense activité inflammatoire, dénomées tuberculoïde réactive (TR) et dimorfo-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 plasmiques, 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 aggressive 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.