

James Venturini

**Hanseníase Dimorfa: perfil de citocinas em sobrenadante
de cultura de células mononucleares e *in situ***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Vilani Moreno

Botucatu-SP

2008

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: Selma Maria de Jesus

Venturini, James.

Hanseníase dimorfa: perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares e *in situ* / James Venturini. – Botucatu : [s.n.], 2008.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, Botucatu, 2008.

Orientadora: Fátima Regina Vilani Moreno

Assunto CAPES: 40101096

1. Hanseníase

CDD 616.998

Palavras-chave: Células mononucleares do sangue periférico; Citocinas Hanseníase; Hanseníase dimorfa; Imunoistoquímica; Imunopatologia

James Venturini

Hanseníase Dimorfa: perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares e *in situ*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina de Botucatu, da UNESP, para obtenção do título de Mestre em Doenças Tropicais.

Professora Doutora Fátima Regina Vilani Moreno - Instituto Lauro de Souza Lima/Bauru

Professora Doutora Maria Sueli Parreira de Arruda - UNESP/Bauru

Professora Doutora Maria Esther Salles Nogueira - Instituto Lauro de Souza Lima/Bauru

Data de aprovação:

Botucatu, de de .

*Não tenho um caminho novo.
O que eu tenho de novo é um jeito de caminhar.*

Thiago de Melo

Dedicatórias

*À minha família, em especial a
Meu pai **Antonio**, minha mãe **Valentina**
Minhas irmãs **Giselle**, **Graziela** e **Isabela**
Minha avó **D. Pida***

*Pelo exemplo de fortaleza nas adversidades da vida,
Pelo apoio incondicional nas decisões mais difíceis,
Pelo amor, carinho e confiança sempre recebidos.*

A Deus

*Por me fortalecer em toda minha trajetória
Pela sustentação nos momentos de dúvidas
Pela lucidez ao perceber as minhas falhas
Pelos pequenos milagres de cada dia.*

*À orientadora Profa Dra Fátima Regina Vilani Moreno,
Pela oportunidade de trabalhar sob sua orientação e pelos ensinamentos recebidos.*

*À Profa Dra Maria Sueli Parreira de Arruda,
Por me estimular incansavelmente para a Ciência.*

*Aos meus Verdadeiros Amigos por tudo o que são
E por tudo o que aprendo com vocês.
Valeu cultivar suas amizades, pois os frutos, além de fartos, são preciosos!*

Aos pacientes, objetivo maior desta atividade científica.

Agradecimentos

*À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior,
pela concessão de bolsa de estudo*

*Aos colaboradores deste estudo, Dr. Fléverson Teixeira Soares, Dra. Andréa de Faria Fernandes Belone, Ms. Jaison Antonio Barreto e Ms. Somei Ura.
Obrigado pela atenção sempre oferecida.*

Ao Dr. Raul Negrão Fleury pela avaliação histopatológica das biópsias.

Ao Dr. José Roberto Pereira Lauris, Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, e ao Dr. Hélio Rubens de Carvalho Nunes, Grupo de Apoio à Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu, pelas análises estatísticas realizadas no presente estudo.

Ao bibliotecário Rafael Mielli Rodrigues, do Instituto Lauro de Souza Lima, pela atenção e por revisar as referências bibliográficas.

Aos funcionários, aprimorandos e estagiários do Instituto Lauro de Souza Lima pelo auxílio neste trabalho e pela amizade conquistada.

Aos pesquisadores do Instituto Lauro de Souza Lima pela amizade, ensinamentos, alegrias e desafios compartilhados no dia-a-dia.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina e do Departamento de Doenças Tropicais, em especial a Solange Sako Pagliari pela atenção e pelos serviços sempre disponibilizados.

*Aos Coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais,
Dra. Jussara Marcondes Machado e Dr. Paulo Câmara
Marques Pereira, pelo carinho recebido e pela formação acadêmica*

*Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais pelos
ensinamentos, em especial aos Professores Doutores:
Alexandrina Sartori, Maria Terezinha Serrão Peraçoli,
Ramon Kaneno e Rinaldo "Tiê" Poncio Mendes.*

*Aos colegas de Pós-Graduação pela amizade e ensinamentos compartilhados, em
especial a: Angela M. R. da Silva, Daniela V. Moris, Douglas R.
Martins, Edson P. de Melo, Elizandra G. Tavian, Eliana Peresi
(Lananã), Gabriela Gryninger, Gustavo H. Kawanani, Mariele P.M.
Picka, Talisia M. Polachite e Sonia M. Ulsó Ruiz Silva.*

*Aos colegas do Laboratório de Imunopatologia Experimental, Unesp-Bauru,
por tudo o que vocês têm realizado e me ensinado a cada dia.*

*Aos Professores Dr. Olavo Speranza de Arruda e
Dra. Ana Maria Bórmio De Rosís, Unesp-Bauru pela amizade e
confiança depositada.*

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	18
LISTA DE TABELAS.....	22
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	24
1. INTRODUÇÃO.....	27
1.1. Aspectos Gerais, Históricos e Sociais da Hanseníase.....	28
1.2. Epidemiologia da Hanseníase.....	30
1.3. Características Biológicas do <i>M. leprae</i>	32
1.4. Manifestações Clínicas da Hanseníase.....	34
1.5. A Resposta Imune na Hanseníase.....	37
1.6. A Resposta Imune na Hanseníase Dimorfa.....	41
2. OBJETIVOS.....	45
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	47
3.1. Casuística.....	48
3.1.1. <i>Pacientes</i>	48
3.1.2. <i>Controles</i>	48
3.2. Materiais e Métodos.....	49
3.2.1. <i>Coleta de sangue</i>	49
3.2.2. <i>Obtenção de células mononucleares</i>	49
3.2.3. <i>Cultura de células mononucleares</i>	50
3.2.4. <i>Quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares</i>	51
3.2.5. <i>Coleta de lesão cutânea</i>	53
3.2.6. <i>Deteção das citocinas IL-10 e TGF-β1 e da enzima iNOS nas lesões cutâneas</i>	54

3.2.7. Avaliação dos cortes histológicos.....	56
3.2.8. Análise Estatística.....	57
4. RESULTADOS.....	58
4.1. Detecção das citocinas IL-10 e TGF-B1 e da enzima iNOS nas lesões cutâneas.....	62
4.2. Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares.....	70
4.2.1. Avaliação dos estímulos inespecíficos e específicos em cultura de células mononucleares.....	70
4.2.2. Grupo Paciente X Grupo Controle.....	77
4.2.3. Grupo HDT X Grupo HDV.....	84
4.3. Correlação entre a produção de citocinas <i>in vitro</i> e <i>in situ</i>	88
5. DISCUSSÃO.....	89
5.1. Perfil de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares.....	91
5.2. Detecção de citocinas e da enzima iNOS nas lesões cutâneas....	101
5.3. Correlação entre os achados das citocinas no sobrenadante de cultura e nas lesões cutâneas.....	107
6. CONCLUSÕES.....	108
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
8. RESUMO.....	131
9. ABSTRACT.....	133
10. APÊNDICE.....	135
11. ANEXO.....	157

Lista de figuras

Figura 1	Gravura mostrando um doente hanseniano na Idade Média usando sino para anunciar sua presença (<i>Medieval leper bell</i> ; Museu Ribes Vikinger, Ribes, Dinamarca).....	29
Figura 2	Lesão cutânea de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) (A.B) e dimorfa-virchoviana (HDV) (C.D.) (HE, A e C: objetiva 10X; B e D: objetiva 40X). (E.F. Faraco-Fite; objetiva 100X).....	60
Figura 3	Índice baciloscópico das lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).....	61
Figura 4	Distribuição dos valores semiquantitativos (0 - 4+) referentes à detecção de IL-10 (A), TGF- β 1 (B) e iNOS (C) nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).....	65
Figura 5	Imunomarcção da citocina IL-10 em cortes histológicos das lesões cutâneas de pacientes dimorfos-tuberculóides (A e B) e dimorfos-virchovianos (C e D). (Imunoistoquímica. A e C: objetiva 10X; B e D: objetiva 40X).....	66
Figura 6	Imunomarcção da citocina TGF- β 1 em cortes histológicos de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (A.B.) e dimorfa-virchoviana (C.D.). (Imunoistoquímica. A e C: objetiva 10X; B e D: objetiva 40X).....	67
Figura 7	Imunomarcção da enzima iNOS em cortes histológicos das lesões cutâneas de pacientes dimorfos-tuberculóides (HDT) (A e B) e dimorfos-virchovianos (HDV) (C e D). (Imunoistoquímica. A e C: objetiva 10X; B e D: objetiva 40X).....	68
Figura 8	Quantificação dos níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). A. Estímulos inespecíficos. B. Estímulos específicos do <i>M. leprae</i>	72
Figura 9	Quantificação dos níveis de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). A. Estímulos inespecíficos. B. Estímulos específicos do <i>M. leprae</i>	73

Figura 10	Quantificação dos níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). A. Estímulos inespecíficos. B. Estímulos específicos do <i>M. leprae</i>	74
Figura 11	Quantificação dos níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). A. Estímulos inespecíficos. B. Estímulos específicos do <i>M. leprae</i>	75
Figura 12	Quantificação dos níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL).....	80
Figura 13	Quantificação dos níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL).....	80
Figura 14	Quantificação dos níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL).....	81
Figura 15	Quantificação dos níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL).....	81
Figura 16	Quantificação dos níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL).....	82
Figura 17	Quantificação dos níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL).....	82
Figura 18	Quantificação dos níveis de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL).....	83
Figura 19	Quantificação dos níveis de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL).....	83

Figura 20	Quantificação dos níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).....	86
Figura 21	Quantificação dos níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).....	86
Figura 22	Quantificação dos níveis de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).....	87
Figura 23	Quantificação dos níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).....	87
Figura 24	Correlação entre a produção de INF- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares e a expressão de iNOS na lesão cutânea de pacientes com hanseníase dimorfa.....	88

Lista de Tabelas

Tabela 1	Detecção das citocinas IL-10 e TGF- β 1 e da enzima iNOS nas lesões cutâneas dos pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).....	64
Tabela 2	Resultados da correlação entre índice baciloscópico (IB), iNOS e as citocinas IL-10 e TGF- β 1 nas lesões dos pacientes com hanseníase dimorfa, independentemente da forma clínica.....	69
Tabela 3	Avaliação dos antígenos específicos do <i>M. leprae</i> com relação à produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL).....	76
Tabela 4	Quantificação de IFN- γ , IL-10, TGF- β 1 e TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL).....	78
Tabela 5	Quantificação de IFN- γ , IL-10, TGF- β 1 e TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL).....	79
Tabela 6	Quantificação de IFN- γ , IL-10, TGF- β 1 e TNF- α e em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).....	85

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABC	Complexo Avidina-Biotina-Peroxidase
Ag	Antígeno
AgSon	Antígeno Sonicado
ANOVA	Análise de variância
BAAR	Bacilos álcool-ácido resistentes
BB	Borderline-Borderline
BL	Borderline-Lepromatoso
BSA	Albumina de Soro Bovino
BT	Borderline-Tuberculóide
CC	Cultura Controle
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTRL	Grupo Controle
DAB	Diaminobenzidina
DP	Desvio-Padrão
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
ENH	Eritema Nodoso Hansênico
GM-CSF	Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
h	Hora
HD	Hanseníase Dimorfa
HDD	Hanseníase Dimorfa-Dimorfa
HDT	Hanseníase Dimorfa-Tuberculóide
HDV	Hanseníase Dimorfa-Virchoviana
HE	Hematoxilina-Eosina
HI	Hanseníase Indeterminada
HT	Hanseníase Tuberculóide
HV	Hanseníase Virchoviana
IB	Índice Baciloscópico
IFN	Interferon
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
LAK	Assassinas ativadas por linfócitos
LAM	lipoarabinomanana
LL	Lepromatoso-Lepromatoso
LPS	Lipopolissacáride

Lista de Abreviaturas e Siglas

min	Minuto
NK	Célula Natural Killer
NOS	Óxido Nitrito Sintase
NR	Não Realizado
NS	Não Significativo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PGL	Glicolípídeo Fenólico
PHA	Fitohemaglutinina
r	Coeficiente de correlação
RIC	Resposta imune celular
RNI	Reativos intermediários do nitrogênio
ROI	Reativos intermediários do oxigênio
RR	Reação Reversa
SST	Solução Salina Tamponada
TGF	Fator Transformador de Crescimento
Th	Linfócito T auxiliar
TNF	Fator de Crescimento Tumoral
Treg	Linfócito regulatório
TT	Tuberculóide-Tuberculóide

Introdução

1.1. Aspectos Gerais, Históricos e Sociais da Hanseníase

Em 1873, o médico norueguês Gerhardt Henrick Armauer Hansen, estudando pacientes ao redor de Bergen, identificou a primeira bactéria patogênica ao homem, o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*), agente etiológico da hanseníase. Em homenagem ao descobridor, a doença foi inicialmente denominada *Morbus Hansen* (MH) ou “Doença de Hansen”.⁽¹⁾

Relatos em diversos materiais antigos com até 3.000 anos de idade fazem referência à hanseníase na Índia, China e Egito. A Bíblia, por exemplo, contém passagens fazendo referência à lepra, mas não se sabe se realmente tratava-se dessa doença, já que esse termo também poderia ter sido utilizado para designar diversas doenças dermatológicas de origem e gravidade variáveis.⁽²⁾

Na Europa, relatos históricos sugerem que a doença tenha aparecido por volta de 300 a.C. e atingiu seu máximo durante a Idade Média. Os conceitos imprecisos a respeito da doença e a impropriedade dos métodos diagnósticos fizeram com que o continente apresentasse, nessa época, 20.000 leprosários, resultado de medidas governamentais que promoviam o isolamento compulsório dos doentes, inclusive com o uso obrigatório de sinos para anunciar sua presença (Figura 1).⁽²⁾



Figura 1. Gravura mostrando um doente hanseniano na Idade Média usando sino para anunciar sua presença (*Medieval leper bell*; Museu Ribes Vikinger, Ribes, Dinamarca).

Esse modelo de internação compulsória perdurou por séculos e se espalhou por quase todo o ocidente. No Brasil, do mesmo modo, leis foram criadas para que os portadores de hanseníase fossem "capturados" e obrigados a viver em leprosários. A internação compulsória dos hansenianos foi revogada em 1962, porém o retorno dos pacientes ao seu convívio social era extremamente dificultoso em razão da pobreza e isolamento social e familiar a que eles estavam submetidos.^(3,4)

Na década de 70, a fim de proporcionar a diminuição do estigma da doença, o Prof. Abraão Rotberg sugeriu uma mudança da terminologia "lepra" para "hanseníase", devido à sua conotação pejorativa e à idéia errônea da doença como sendo altamente contagiosa, mutilante e incurável.⁽⁵⁾ Inicialmente, o Governo do Estado de São Paulo adotou essa terminologia e,

em seguida, o Governo Federal.^(6,7) No entanto, somente em 1995 o uso da terminologia “hanseníase”, em substituição ao termo “lepra”, tornou-se obrigatória.⁽⁸⁾ Somado à tentativa de diminuir o estigma da doença, em 2007, o Governo Federal passou a conceder pensão mensal vitalícia e intransferível, a título de indenização, no intuito de reparar as consequências sociais, econômicas e culturais dos portadores de hanseníase que sofreram internação compulsória em sanatório ou asilo-colônia.⁽⁹⁾

Atualmente, mesmo com o tratamento da doença e somado aos esforços governamentais e as iniciativas não-governamentais em promover a conscientização acerca dos seus mitos, as incapacidades físicas decorrentes da própria patologia afetam a capacidade de trabalho do indivíduo, o que resulta em limitações sociais com consequências psicológicas, gerando discriminação e segregação dos doentes.⁽¹⁰⁾

1.2. Epidemiologia da Hanseníase

O ser humano é considerado o principal hospedeiro do *M. leprae*. É consenso geral entre os hansenologistas que a transmissão do bacilo se dê através do contato prolongado e íntimo entre pacientes multibacilares não tratados e indivíduos não infectados.⁽¹¹⁾ Além disso, fatores genéticos do hospedeiro e ambientais, como desnutrição, higiene e baixo nível sócio-econômico, estariam associados a transmissão da doença.^(12,13) Como o *M. leprae* é detectado em grande quantidade na boca e nariz de pacientes

altamente bacilíferos, pesquisadores têm sugerido as vias aéreas superiores como importante porta de entrada do bacilo.⁽¹⁴⁻¹⁶⁾

A frequência de indivíduos com hanseníase é quase que exclusivamente observada em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, sendo que, de modo geral, as pessoas de baixa condição sócio-econômica são afetadas por essa doença. Em 2006, 259.017 indivíduos foram acometidos pela hanseníase, sendo o Brasil o principal país endêmico com 44.436 doentes, representando um coeficiente de prevalência de 2,35 casos por 10.000 habitantes. As regiões Norte, Nordeste e Sudeste contribuem com 80% dos casos novos.^(17,18)

O Ministério da Saúde do Brasil, seguindo orientações da Organização Mundial de Saúde (OMS), adotou a meta de eliminação da hanseníase, como um problema de saúde pública, almejando alcançar o índice de prevalência de menos de um doente em cada 10.000 habitantes até o ano 2005.⁽¹⁰⁾ Entretanto, apesar dos esforços, a meta de eliminação proposta não foi alcançada.

Atualmente, o Plano Estratégico para Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010, proposto pelo Ministério da Saúde, apresenta como estratégia o alcance de baixos níveis endêmicos dessa doença através de atividades de controle que estejam disponíveis e acessíveis a todos os indivíduos nos serviços de saúde mais próximos de suas residências.⁽¹⁹⁾

Embora o número de pacientes tenha decaído nas últimas décadas no mundo todo, principalmente pela adoção do tratamento multidrogas, o número de casos novos permanece elevado.⁽²⁰⁻²²⁾ Estudos utilizando modelos matemáticos, alicerçados em dados epidemiológicos, sugerem que a doença

tende a permanecer como um importante problema de saúde pública por várias décadas.⁽²³⁾

1.3. Características Biológicas do *M. leprae*

O agente etiológico da hanseníase é um parasita intracelular obrigatório, imóvel, não formador de esporos, microaerófilo, Gram positivo e álcool-ácido resistente, corando-se em vermelho pelo método de Ziehl-Neelsen.⁽²⁴⁾ Apresenta-se sob a forma de bastonete, reto ou levemente encurvado, com as extremidades arredondadas e mede aproximadamente 1,0-8,0 µm de comprimento e 0,3 µm de diâmetro.⁽²⁵⁾ A parede celular do *M. leprae* é composta por um complexo formado por ácido micólico, peptideoglicana e arabinogalactana, comum entre micobactérias.⁽²⁶⁻²⁸⁾ Particularmente, na camada externa do *M. leprae* estão agrupados componentes lipídicos, entre eles o glicolípídeo fenólico I (PGL-I) e a lipoarabinomanana (LAM), sendo o primeiro exclusivo dessa espécie entre as micobactérias.⁽²⁹⁻³¹⁾

O *M. leprae* possui a característica de não ser cultivável em meios artificiais, o que dificulta os diversos estudos laboratoriais. Muito se tem aprendido sobre a natureza do bacilo através de manipulações bioquímicas e genéticas das cepas de micobactérias cultiváveis como o *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. smegmatis* e *M. bovis*.⁽³²⁾ Ainda assim, os estudos acerca das propriedades metabólicas, antigênicas e de patogenicidade são realizados por meio do isolamento do *M. leprae* a partir de tecidos infectados, podendo ser

mantido por algumas semanas em meio 7H12 à 33°C, ou por meio da utilização de modelos animais, que incluem o tatu e camundongos da linhagem BALB/c ou nude.⁽³³⁻³⁵⁾

Um dos primeiros antígenos a ser utilizado na prática laboratorial foi o antígeno de Mitsuda ou lepromina, que consiste em um antígeno bruto, não purificado, preparado a partir de hansenomas obtidos de pacientes bacilíferos.^(36,37) É utilizado, até hoje, para avaliar o grau de resposta imune celular do indivíduo frente ao bacilo através do inóculo intradérmico do preparado; a reação de Mitsuda positiva (reação de hipersensibilidade tipo IV) reflete a capacidade do organismo em eliminar o bacilo.⁽³⁸⁾

Por se tratar de um antígeno rudimentar, os pesquisadores têm se empenhado na obtenção de antígenos específicos tanto para auxiliar o diagnóstico e classificação da doença, como para detectar a infecção assintomática ou o diagnóstico precoce antes de ocorrer seqüelas decorrentes da imunopatologia da doença.⁽³⁸⁾

Alguns antígenos purificados têm sido utilizados para diversos estudos da resposta imune humoral e celular. Componentes lipídicos da parede celular do *M. leprae*, como o PGL-I e o LAM, são empregados para avaliação da resposta imune humoral; enquanto que antígenos íntegros ou extratos protéicos do bacilo têm sido utilizados como instrumentos de avaliação da resposta imune celular.⁽³⁹⁻⁴¹⁾

Com a finalização do sequenciamento do genoma do *M. leprae*, os pesquisadores obtiveram informações sobre a natureza do bacilo, que podem auxiliar nos estudos epidemiológicos e na elucidação da predileção da

micobactéria por um estilo de vida intracelular. Essas informações associadas ao estudo genético humano têm possibilitado um novo conhecimento sobre a relação hospedeiro-parasita e possibilitará a otimização ou desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapêuticos da doença.⁽³²⁾

1.4. Manifestações Clínicas da Hanseníase

Após a entrada do *M. leprae* no organismo, admite-se que, em alguns casos, o bacilo seja eliminado; em outros, embora ocorra multiplicação bacilar, o indivíduo consegue debelar a infecção ainda em seu estágio subclínico. Nos casos em que isso não acontece, a doença se estabelece.⁽⁴²⁾

A hanseníase apresenta, como característica notável, um amplo espectro de manifestações clínicas e histopatológicas, cujas evidências sugerem que a resistência parcial ou completa ao *M. leprae* está na dependência da resposta imune mediada por células.⁽⁴³⁻⁴⁶⁾

Ao longo da história da hanseníase, diversas formas de classificar essa doença foram propostas e, atualmente, as mais utilizadas são a de Madri, Ridley & Jopling e a proposta pela OMS.

Segundo os critérios estabelecidos no Congresso Internacional de Madri, a hanseníase pode ser classificada em dois tipos polares: tuberculóide (HT) e virchoviano (HV), e dois grupos instáveis: indeterminado (HI) e dimorfo (HD).⁽⁴⁷⁾

Em relação aos tipos polares, a forma tuberculóide, considerada de maior resistência, caracteriza-se por apresentar raras lesões cutâneo-nervosas

bem localizadas, com bacilos escassos ou ausentes e granulomas tuberculóides, constituídos por agregados de macrófagos com diferenciação epitelióide bem evidente, por células gigantes multinucleadas tipo Langhans no centro dos granulomas e por halo denso de linfócitos contornando esses granulomas. A reação de Mitsuda é positiva nesses pacientes. Essa variedade é estável em suas características e tende, na sua evolução, para a cura com ou sem tratamento.^(42,48)

Na forma virchoviana, de menor resistência, as lesões cutâneo-neurais e viscerais são disseminadas e com inúmeros bacilos; a reação de Mitsuda é negativa e o quadro histopatológico é constituído por extenso infiltrado celular composto por macrófagos com citoplasma carregado de bacilos e por escassos linfócitos.^(42,48)

De modo geral, acredita-se que as lesões virchovianas refletem o fracasso da resposta imune celular em conter os bacilos, enquanto que as lesões tuberculóides resultam do controle imunológico sobre o crescimento bacilar.^(38,41,42)

Entre estes dois pólos estáveis, existe o grupo dimorfo, com manifestações intermediárias variáveis entre tuberculóide e virchoviano de acordo com o grau de resposta imune ao *M. leprae*. Este grupo não apresenta cura espontânea e, ao contrário dos tipos polares, apresenta manifestações instáveis com tendência a mudar suas características em direção ao pólo virchoviano quando não tratado.⁽⁴²⁾

A hanseníase indeterminada é considerada a fase inicial da doença e caracteriza-se por máculas hipocrômicas ou áreas circulares de pele

aparentemente normal com distúrbios de sensibilidade. A baciloscopia de material originário da lesão é negativa. Se não for tratada pode evoluir para uma das formas características da doença ou curar-se espontaneamente.⁽⁴²⁾

Ridley & Jopling propuseram uma classificação baseada em critérios clínicos, imunológicos, baciloscópicos e histopatológicos.⁽⁴⁴⁾ O grupo dimorfo (borderline) foi subdividido e passou a incluir os casos próximos aos pólos tuberculóide e virchoviano à medida que se diferenciavam conforme esses critérios. Criou-se, assim, um espectro no qual os extremos eram constituídos pelos tipos polares tuberculóide (TT) e lepromatoso (LL) e os borderlines, subdivididos em: borderline-tuberculóide (BT), borderline-borderline (BB) e borderline-lepromatoso (BL).

Em 1982, a OMS simplificou a classificação da hanseníase para fins operacionais com a introdução da poliquimioterapia e dividiu os pacientes de acordo com o índice baciloscópico em multibacilares e paucibacilares, respectivamente com índice baciloscópico maior ou igual a dois e menor que dois. Deste modo, os paucibacilares passaram a abranger os pacientes tuberculóides, dimorfos próximos ao pólo T e indeterminados, enquanto os multibacilares compreendem os pacientes virchovianos e dimorfos.⁽⁴⁹⁾

Posteriormente, a OMS adotou uma classificação essencialmente clínica, que utiliza o número de lesões cutâneas e/ou troncos nervosos acometidos. De acordo com essa classificação são considerados paucibacilares os casos de hanseníase com até cinco lesões e/ou apenas um tronco nervoso acometido e, multibacilares, os casos com mais de cinco lesões cutâneas e/ou mais de um tronco nervoso acometido. Portanto, do ponto de vista

operacional, o Ministério da Saúde optou pelo método classificatório baseado na contagem do número de lesões.⁽¹⁰⁾

1.5. A Resposta Imune na Hanseníase

Acredita-se que os macrófagos sejam as primeiras células do sistema imune a interagir com o *M. leprae*.⁽³²⁾ Nos casos em que essa interação não desencadeia uma resposta imune articulada e equilibrada, o bacilo pode se multiplicar dentro da célula e, desse modo, estabelecer a doença. Os macrófagos desempenham papel preponderante nesse processo por estarem envolvidos em diversos mecanismos da imunidade inata e adquirida do hospedeiro.

Como o *M. leprae* é um parasita intracelular obrigatório, a resistência depende da imunidade mediada por células, representada pela fagocitose dos bacilos pelos macrófagos, processamento dos antígenos e apresentação dos determinantes antigênicos aos linfócitos T auxiliares (Th). Esses linfócitos devidamente estimulados passam a proliferar e a produzir citocinas de perfil Th1, especificamente interferon-gama (IFN- γ), que ativa os macrófagos. Essas células ativadas exercem importante papel na resistência do hospedeiro, por meio da liberação de metabólitos bactericidas e mediadores imunológicos, que potencializam as funções fagocíticas, microbicidas e citotóxicas.⁽⁵⁰⁾

Na hanseníase tuberculóide observa-se uma intensa ativação de macrófagos na presença de grande quantidade de IFN- γ , produzido por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e células NK, ativadas ou não por linfocinas (células

LAK), levando à eliminação do bacilo. Na forma virchoviana, a inabilidade dos macrófagos para matar o *M. leprae* é um aspecto predominante desta forma clínica, conseqüentemente os macrófagos estão abarrotados de bacilos no seu interior.⁽⁴¹⁾

Os estudos imunoistoquímicos das lesões cutâneas de pacientes com hanseníase revelam diferenças na taxa de linfócitos T CD4:CD8 nos pólos do espectro. Em lesões de pacientes tuberculóides a população CD4⁺ predomina com uma taxa CD4:CD8 de 1,9:1; os linfócitos T CD4⁺ estão em justaposição com macrófagos, no centro do granuloma, e células T CD8⁺ estão restritas ao manguito que contorna o granuloma. Os linfócitos T CD4⁺ presentes no centro do granuloma são de fenótipo T-memória e por estarem localizados próximos de macrófagos, pesquisadores sugerem que eles possam ter um papel na ativação e maturação desses macrófagos, levando-os a eliminar o patógeno. Os linfócitos T-naive estão localizados no manguito linfocitário envolta do granuloma, perto dos linfócitos T CD8⁺.⁽⁵¹⁻⁵³⁾ Ao contrário, nas lesões de pacientes virchovianos a população de linfócitos T CD8⁺ predomina com uma taxa CD4:CD8 de 0,6:1; esses linfócitos CD8⁺ estão misturados com macrófagos e linfócitos T CD4⁺. A maioria dos linfócitos T CD8⁺ são de fenótipo CD28⁻, indicando que são células T supressoras, enquanto os linfócitos de fenótipo citotóxico (CD28⁺) predominam nas lesões tuberculóides. Como as células presentes nas lesões virchovianas são de fenótipo T-supressor, alguns estudos sugerem que elas possam atuar suprimindo a resposta mediada por células.⁽⁵¹⁻⁵³⁾

O espectro de resposta do hospedeiro ao *M. leprae* fornece um modelo

para investigar o papel das citocinas na patogênese desta doença. Há correlação das formas clínicas da hanseníase com a presença de citocinas, como a Interleucina-2 (IL-2) e IFN- γ em pacientes tuberculóides e IL-4, IL-5 e IL-10 em pacientes virchovianos.^(41,54-56)

A correlação das formas clínicas com a presença de citocinas também está associada com o grau de ativação dos fagócitos mononucleares, que na forma tuberculóide secretam citocinas com atividade inflamatória envolvidas na formação do granuloma, como IL-1 β , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e IL-12 - mediador importante na geração da resposta de citocinas Th1 presentes nesta forma clínica.⁽⁵⁷⁻⁵⁹⁾ Em contraste, na forma virchoviana os macrófagos secretam principalmente IL-10, citocina desativadora de macrófagos e supressora da proliferação de células Th1.⁽⁵⁴⁾

A participação do fator transformador de crescimento-beta (TGF- β) também tem sido investigada nos mecanismos imunopatológicos da hanseníase. Goulart et al. evidenciaram a presença de grande quantidade dessa citocina em lesões cutâneas de pacientes com hanseníase virchoviana, enquanto que em lesão de paciente tuberculóide esta citocina não foi encontrada.⁽⁶⁰⁾ Segundo os autores, a presença de TGF- β e o predomínio de linfócitos T CD8⁺ no pólo virchoviano favoreceriam a depressão imune e a multiplicação bacilar.

A ativação de macrófagos resulta no aumento da produção dos reativos intermediários do oxigênio (reactive oxygen intermediates - ROI) e do nitrogênio (reactive nitrogen intermediates - RNI), que são sistemas bioquímicos antimicrobianos dos fagócitos mononucleares de vital importância

na defesa do organismo contra infecções.

Com relação aos RNI, o óxido nítrico (NO) é um gás altamente reativo produzido a partir da L-arginina sob a ação de isoenzimas, denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Existem três isoformas de NOS, denominadas NOS endotelial (eNOS), NOS neural (nNOS) e NOS induzível (iNOS).⁽⁶¹⁾ A iNOS, responsável pela síntese do NO, é expressa por células inflamatórias por meio de diversos estímulos, dentre eles os lipopolissacarídeos, fragmentos antigênicos de micobactérias, fungos e protozoários, e por citocinas inflamatórias como IL-1, TNF- α e IFN- γ . Em contrapartida, as citocinas IL-10, IL-4 e TGF- β inibem a expressão de iNOS e conseqüentemente a produção de NO por macrófagos.⁽⁶²⁾

A síntese de NO tem sido observada em macrófagos e células gigantes multinucleadas, bem como em outras células, como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, células de Langerhans, eosinófilos, neutrófilos, linfócitos T CD4⁺, osteoclastos e osteoblastos, podendo ter vários efeitos dependendo do tipo de célula que o produz, do sítio de liberação e da concentração produzida.⁽⁶²⁻⁶⁸⁾ A reatividade do NO, da mesma forma que o oxigênio, está relacionada com suas propriedades redox; NO e ânion superóxido reagem para formar peroxinitrito (ONOO⁻), molécula altamente oxidante, potencialmente mais tóxica que o próprio NO.⁽⁶⁹⁾

Na hanseníase, Adams et al. ao estudarem *in vitro* os efeitos do NO, produzido por macrófagos murinos ativados, sobre o *M. leprae* verificaram que esse metabólito inibia a multiplicação do bacilo e sugeriram que os RNI se constituíam em um possível sistema antimicrobiano de macrófagos ativados

contra o *M. leprae*.⁽⁷⁰⁾ Corroborando essa assertiva, Khanolkar et al., estudando a relação entre a expressão de iNOS e TGF- β nas lesões cutâneas de pacientes com diferentes formas clínicas da hanseníase, verificaram positividade para o TGF- β e ausência de células imunomarcadas pelo iNOS em pacientes virchovianos, enquanto nos pacientes tuberculóides, os resultados foram inversos aos obtidos no pólo virchoviano.⁽⁷¹⁾

1.6. A resposta Imune na Hanseníase Dimorfa

O paradigma imunológico nas formas clínicas tuberculóide e virchoviana está bem estabelecido; entretanto, no grupo dimorfo, os pacientes exibem instabilidade imunológica e apresentam características clínicas, bacteriológicas e histopatológicas variadas, o que faz com que ora se aproximem do pólo virchoviano, ora do pólo tuberculóide.

A hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) caracteriza-se por apresentar lesões cutâneas com raros bacilos e granulomas de células epitelióides focalizadas por zona periférica de linfócitos com presença de células gigantes multinucleadas tipo Langhans e tipo corpo estranho; a reação de Mitsuda é fracamente positiva ou duvidosa e a baciloscopia é fracamente positiva com bacilos granulosos e raros bacilos íntegros.⁽⁴⁸⁾

A hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) é caracterizada por apresentar lesões infiltrativas de bordos difusos com grande número de bacilos; a reação de Mitsuda é negativa e os granulomas são compostos por macrófagos indiferenciados e infiltração linfocitária. Os casos dimorfos-dimorfos (HDD)

são poucos e clinicamente tendem a mover-se para um dos pólos.⁽⁴⁸⁾

De modo geral, tem se postulado que o comportamento das citocinas no grupo dimorfo estaria associado com a proximidade desses pacientes nos pólos tuberculóide ou virchoviano. Contudo, os estudos referentes a esse aspecto são escassos. McClean et al., por exemplo, verificaram que embora as lesões de pacientes HDT apresentavam maior número de células CD4⁺ e pacientes HDV, CD8⁺, os pesquisadores não encontraram diferenças significativas quanto à produção de IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 e IL-6.⁽⁷²⁾ Segundo os autores, esses achados sugerem que as diferenças fenotípicas dos linfócitos na lesão não estariam associadas a produção de citocinas.

No estudo realizado por Goulart et al., a pesquisa de TGF- β nas lesões cutâneas de pacientes dimorfos, mostrou intensa marcação no subgrupo de menor resistência (HDV), sugerindo que essa citocina contribuiria para a não formação da lesão granulomatosa e impediria a atividade microbicida dos macrófagos.⁽⁶⁰⁾ No subgrupo de maior resistência (HDT) não houve imunorreação detectável nas células dos granulomas e, segundo os autores, este achado poderia ser explicado pela presença de resposta imune celular específica ao *M. leprae*, determinando diferenciação das células macrofágicas com formação de granulomas epitelióides capazes de eliminar a maioria dos bacilos.⁽⁶⁰⁾ Resultados diferentes foram encontrados por Khanolkar-Young et al., que verificaram positividade para essa citocina em pacientes HDT.⁽⁷¹⁾

Recentemente, um estudo realizado por Anderson et al. revelou positividade à essa citocina em 10-30% das células nos granulomas de 4 pacientes que foram agrupados como HDT/HDV.⁽⁷³⁾

Arnoldi et al. ao pesquisarem a presença de TNF- α nas lesões cutâneas de pacientes dimorfos, não encontraram positividade nos pacientes HDV, enquanto nos pacientes HDT somente algumas células foram marcadas.⁽⁵⁷⁾ Khanolkar-Young et al. estudando 4 pacientes HDT e 3 HDV encontram 0-17% e 0-10% de positividade nas células, respectivamente.⁽⁷⁴⁾ Resultados semelhantes foram observados no estudo de Anderson et al. em pacientes agrupados como HDT/HDV.⁽⁷³⁾

Recentemente, Belone pesquisou a presença de IL-10 e iNOS em lesões cutâneas de pacientes HDT com reação tipo 1 e sem reação.⁽⁷⁵⁾ Nesse estudo, os pacientes reacionais exibiram maior número de células expressando IL-10, enquanto nos pacientes sem reação a enzima iNOS estava presente em maior número; segundo a autora, esse achado revela uma tendência de correlação negativa entre essas duas variáveis. Do mesmo modo, Schon et al. verificaram a presença de iNOS nos pacientes HDT e HDV, entretanto somente nas lesões dos HDT mais de 20% das células estavam coradas.⁽⁶³⁾ Diferentemente desses achados, foram os estudos realizados por Khanolkar-Young et al. que não encontraram a presença dessa enzima em pacientes HDT.⁽⁷¹⁾

No que se refere à pesquisa de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), os dados de literatura revelam que o número de pacientes dimorfos avaliados, em geral, é pequeno; além disso existe uma tendência dos pesquisadores em agrupar os resultados de pacientes HDT com pacientes tuberculóides.^(76,77) Com relação aos pacientes HDV, alguns estudos apresentam os resultados juntamente com pacientes HDD, enquanto outros, com pacientes virchovianos^(60,76). Misra et

al., ao avaliarem o perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de PBMC de 07 pacientes HDT e HDV, verificaram perfis Th1 e Th0 em pacientes HDT, enquanto pacientes HDV exibiram perfis Th2 e Th0.⁽⁷⁸⁾

Com base no exposto e considerando o papel das citocinas nas interações celulares e os poucos estudos abordando a participação desses mediadores na relação hospedeiro-parasita de pacientes dimorfos julgamos oportuna a realização deste trabalho que tem por finalidade quantificar citocinas macrofágicas e linfocitárias em sobrenadante de cultura de células mononucleares e nas lesões cutâneas dos pacientes.

Objetivos

Avaliar a participação de citocinas macrofágicas e linfocitárias na resposta imune de pacientes com hanseníase dimorfa, particularmente dimorfos-tuberculóides e dimorfos-virchovianos virgens de tratamento, mediante os seguintes parâmetros:

- quantificação de IL-10, TGF- β 1, TNF- α e IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares;
- detecção das citocinas IL-10, TGF- β 1 e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) nas lesões cutâneas;
- correlação dos resultados da quantificação das citocinas no sobrenadante de cultura com aqueles encontrados *in situ*;
- comparação dos resultados obtidos entre os dois subgrupos de pacientes com hanseníase dimorfa.

Pasuística e Métodos

3.1. Casuística

3.1.1. Pacientes

Participaram deste estudo 19 pacientes portadores de hanseníase dimorfa, virgens de tratamento, atendidos no Serviço de Dermatologia Dr. Diltor Opromolla, do Instituto Lauro de Souza Lima, de Bauru. Destes pacientes, 07 foram classificados como dimorfos-tuberculóides (HDT) e 12 dimorfos-virchovianos (HDV), de acordo com Ridley & Jopling (1966).⁽⁴⁴⁾ Todos os pacientes não estavam recebendo tratamento medicamentoso. Dos pacientes HDT, 03 eram do sexo masculino e 04 do sexo feminino, com média de idade de 38,3 anos (26-70). Entre os pacientes HDV, 10 pertenciam ao sexo masculino e 02 ao sexo feminino; a média de idade era de 49,1 anos (12-54).

A Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto Lauro de Souza Lima emitiu parecer favorável à realização deste estudo (Anexo). Os pacientes foram instruídos quanto à pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

3.1.2. Controles

Participaram ainda deste trabalho, 19 indivíduos adultos sadios, sendo 13 do sexo masculino e 06 do sexo feminino, com média de idade semelhante à dos pacientes. Do mesmo modo que os pacientes, a inclusão dos indivíduos do grupo controle esteve vinculada a consentimento prévio dos mesmos.

3.2. Materiais e Métodos

3.2.1. Coleta de sangue

Foram coletados 20 ml de sangue venoso de cada paciente e do grupo controle, através do sistema Vacutainer, em 2 tubos contendo anticoagulante heparina. Os tubos foram centrifugados por 5 min a 500 rpm e utilizados na obtenção das células mononucleares.

3.2.2. Obtenção de células mononucleares

As células mononucleares foram separadas através do gradiente de densidade Ficoll-Hypaque.⁽⁷⁹⁾ Resumidamente, o plasma dos 2 tubos foi coletado e o seu volume foi dobrado com solução salina 0,85%. O plasma diluído foi colocado, lenta e cuidadosamente, sobre o Ficoll-Hypaque na proporção de 1 ml do gradiente de separação para 2 ml de plasma e centrifugado durante 30 min a 1500 rpm. Após centrifugação, o anel de células mononucleares foi coletado e lavado por 2 vezes, sendo uma vez com solução salina 0,85% e a outra com RPMI-1640, a 1500 rpm por 10 min. As células mononucleares foram ressuspensas em 1 ml de meio RPMI-1640 contendo L-glutamina e 25 mM de tampão HEPES adicionado de soro fetal bovino a 10% e penicilina (100 UI/ml)-estreptomicina (100 µg/ml). A determinação do número total de células mononucleares foi realizada através de uma diluição 1:2 com corante Turck a 5% em ácido acético glacial a 4% e contagem em câmara de Neubauer. A viabilidade das suspensões celulares foi determinada com azul

Trypan a 0,1% em solução salina tamponada (SST) pH 7,2. A concentração final foi ajustada para 2×10^6 células/ml.

Esses procedimentos foram realizados em condições assépticas. Para tanto, todos os materiais e reagentes utilizados foram previamente esterilizados e todos os passos foram realizados na capela de fluxo laminar, previamente submetida à irradiação com luz ultravioleta por 15 minutos.

3.2.3. Cultura de células mononucleares

O volume de 100 µl da suspensão de células (2×10^5 células/orifício) foi distribuído em placas de cultura de tecido, de fundo plano e com tampa, contendo 96 orifícios, de acordo com o protocolo:

- a. 8 µg/ml de PHA-M (fitohemaglutinina)*;
- b. 10 µg/ml de LPS (lipopolissacáride da *E. coli*)*,
- c. 1 µg/ml de antígeno integral do *M. leprae* (2 bacilos:1 célula mononuclear) (Ag2)[◇];
- d. 4 µg/ml de antígeno integral do *M. leprae* (8 bacilos:1 célula mononuclear) (Ag8)[◇];
- e. 10 µg/ml de antígeno sonificado do *M. leprae* (AgSon)[◇];
- f. nenhum estímulo foi adicionado (produção espontânea) - cultura controle (CC) .

* A concentração dos estímulos inespecíficos foi determinada através de experimentos prévios de dose x resposta.

[◇] Os antígenos do *M. leprae* (integral e sonificado) foram cedidos pelo Dr. Patrick Brennan, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, USA.

A placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 48 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 1500 rpm por 10 min, aliquotados e estocados a -70°C para posterior dosagem das citocinas: IL-10, TGF-β1, TNF-α e IFN-γ.

3.2.4. Quantificação de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares

A quantificação das citocinas IL-10, TGF-β1, TNF-α e IFN-γ foi realizada pelo método imunoenzimático ELISA, que se baseia no uso de placas de poliestireno com 96 orifícios recobertos pelo anticorpo monoclonal específico para a citocina que foi quantificada, conforme orientação do fabricante. Foram utilizados *Kits DuoSet* da R&D Systems com os seguintes números de catálogos: TNF-α (DY210), IL-10 (DY217B), TGF-β1 (DY240) e IFN-γ (DY285). Os ensaios foram realizados de acordo com as orientações do fabricante.

3.2.4.1. Sensibilização da placa com anticorpo de captura. 100 µl do anticorpo monoclonal de captura, diluído em SST, foram adicionados à placa de 96 poços, de acordo com a concentração sugerida pelo fabricante: TNF-α (4,0 µg/ml), IL-10 (2,0 µg/ml), TGF-β1 (2,0 µg/ml) e IFN-γ (6,0 µg/ml). Para adsorção do anticorpo, a placa foi incubada overnight, à temperatura ambiente. Em seguida, cada poço foi aspirado e lavado por 3 vezes com 400 µl de tampão de lavagem.

3.2.4.2. Bloqueios dos sítios inespecíficos. Os sítios inespecíficos foram bloqueados através da adição de 300 µl do tampão de bloqueio apropriado para

cada citocina. A placa foi incubada por 1 hora, à temperatura ambiente e em seguida, foi realizado o procedimento de lavagem.

3.2.4.3. Preparação das amostras. 100 µl do sobrenadante de cultura foram adicionados, em duplicata, aos orifícios da placa, a qual foi incubada por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, a placa foi submetida ao procedimento de lavagem. Para a dosagem do TGF-β1, as amostras foram previamente ativadas. Para tanto, 100 µl de HCl 1N foram adicionados à 500 µl da amostra; após homogeneização e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, as mesmas foram neutralizadas com a adição de 100 µl de NaOH 1,2N e HEPES 0,5M. Em seguida, 100 µl de cada amostra foi adicionada em duplicata na placa; adicionalmente, foram acrescentados 100 µl de meio RPMI-1640 contendo soro fetal bovino a 10%, penicilina e estreptomicina (também previamente ativados), utilizado no protocolo de obtenção de cultura*. O background do TGF-β1 encontrado no meio de cultura foi subtraído das amostras testes e o valor da concentração corrigido, multiplicando-se os resultados pelo fator de diluição 1,4.

3.2.4.4. Incubação com anticorpo de detecção. 100 µl do anticorpo monoclonal de detecção, diluído em tampão diluente, foram adicionados à placa de 96 poços, de acordo com a concentração sugerida pelo fabricante: TNF-α (250 ng/ml), IL-10 (200 ng/ml), TGF-β1 (300 ng/ml) e IFN-γ (75 ng/ml). A placa foi

* Esse procedimento se faz necessário, pois níveis significantes de TGF-β1 latente são encontrados em soro bovino.

incubada por 2 horas em temperatura ambiente e, em seguida, submetida ao procedimento de lavagem.

3.2.4.5. Incubação com solução peroxidase conjugada com estreptavidina. 100 µl da solução peroxidase conjugada com estreptavidina, diluída 1:200 em tampão diluente, foram adicionados aos poços da placa. A placa foi incubada por 20 minutos à temperatura ambiente e submetida ao procedimento de lavagem.

3.2.4.6. Incubação com substrato e leitura. 100 µl do substrato contendo tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram adicionados em cada poço. A placa foi deixada em câmara escura por 20 minutos à temperatura ambiente e em seguida, 50 µl da solução *stop* (ácido sulfúrico 4N) foram adicionados aos poços para bloquear a reação. A atividade enzimática foi avaliada por leitura espectrofotométrica em 450nm e corrigida em 540nm. Os resultados foram expressos em pg/ml, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio com a utilização do Software GraphPad InStat 3.06, 32 bit for Windows (2003).

3.2.5. Coleta de lesão cutânea

Fragmento de pele da lesão de cada paciente foi coletado por meio de biópsia. O fragmento foi fixado em formalina a 10% por 24 h e preparado pela técnica habitual para inclusão em parafina. Cortes histológicos de 4 µm de

espessura foram corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e Faraco-Fite.^(80,81) O restante do material incluído foi reservado para a pesquisa de citocinas e da enzima iNOS nas lesões, por método imunoistoquímico.

3.2.6. Detecção das citocinas IL-10 e TGF- β 1 e da enzima iNOS nas lesões cutâneas

A detecção das citocinas IL-10 e TGF- β 1 e da enzima iNOS nas lesões cutâneas foi realizada por método imunoistoquímico. Para tanto, cortes histológicos seriados de 4 μ m de espessura foram colocados sobre lâminas silanizadas e a seguir submetidos a processos de fixação, desparafinização e hidratação. Após esses procedimentos, as lâminas foram submetidas aos seguintes tratamentos:

- incubação com H₂O₂ a 3% em SST, por 30 min, para bloqueio da peroxidase endógena;
- duas lavagens em água destilada, por 5 min cada;
- para recuperação antigênica das citocinas, as lâminas foram incubadas com tripsina 0,25% em SST por 60 min à temperatura ambiente. Para a recuperação antigênica da enzima iNOS, as lâminas foram incubadas por 20 min em tampão citrato (10 mM pH 6,0) previamente aquecido a 95°C em banho-maria; em seguida, as lâminas foram resfriadas à temperatura ambiente por 20 min;
- lavagens em SST, por 5 min;
- para o bloqueio da biotina endógena, as lâminas foram incubadas com soro humano AB, 10% em SST, por 30 min à temperatura ambiente;

- incubação à 4°C, overnight, com os anticorpos primários diluídos em albumina de soro bovino (BSA) - anti-IL-10 (1:10), anti-TGF- β 1 (1:50) e anti-iNOS (1:250);

- lavagens em SST, por 5 min;

- para a detecção de IL-10 e iNOS, as lâminas foram incubadas por 30 min com o Sistema Dako EnVision⁺ mice e rabbit, respectivamente. Para a pesquisa de TGF- β 1, as lâminas foram incubadas por 60 min com anticorpo policlonal anti-IgG de cabra (diluição 1:150); em seguida, foram lavadas em SST por 5 min e, posteriormente, incubadas com o complexo ABC (avidina-biotina-peroxidase) por 45 min;

- lavagens em SST, por 5 min;

- incubação com solução DAB (3',3' tetrahydrocloro de diaminobenzidina) na concentração de 1 mg/ml em SST à qual foi adicionado solução de H₂O₂ à 1%, por 5 min;

- lavagens em água destilada;

- contracoloração com hematoxilina de Harris por 50 seg,

- lavagens em água corrente; desidratação com banhos de álcool, em ordem crescente;

- diafanização em banhos de xilol e montagem em resina Permount.

Como controle positivo dos marcadores foram utilizados cortes histológicos de lesões cutâneas de pacientes com doença de Jorge Lobo, previamente caracterizados e empregados como padrão de controle histopatológico. Como controles negativos foram utilizados: 1) omissão dos anticorpos primários nos cortes histológicos empregados como controle positivo; 2) substituição dos anticorpos primários pelos soros normais de cabra

e de coelho nas respectivas diluições dos anticorpos primários; 3) cortes histológicos de pele normal obtida de espécime cirúrgico de mamoplastia. A coloração positiva foi identificada por coloração marrom do citoplasma da célula.

3.2.7. Avaliação dos cortes histológicos

A avaliação dos cortes histológicos submetidos à imunoistoquímica foi realizada por 3 observadores independentes, de forma semiquantitativa de 0 a 4+, sendo: 0= ausente; 1+= mínimo ; 2+= discreto; 3+= moderado; 4+= intenso.⁽⁸²⁾

Os bacilos álcool-ácido resistentes (BAAR) foram avaliados nos cortes histológicos utilizando a escala de 0-6+ de acordo com Ridley, sendo:⁽⁸³⁾

0 = ausente;

1+ = 1-10 bacilos em 100 campos;

2+ = 1-10 bacilos em 10 campos;

3+ = 1-10 bacilos por campo;

4+ = 10-100 bacilos por campo;

5+ = 100-1000 bacilos por campo;

6+ = mais de 1000 bacilos por campo.

3.2.8. Análise Estatística

Para verificar diferenças na quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células entre pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide, dimorfa-virchoviana e grupo controle foi utilizado o teste T Student. Para verificar diferenças entre a produção de citocinas pelas células mononucleares, estimuladas ou não, de pacientes e controles foram empregados a análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. Para verificar diferenças na detecção de citocinas e da enzima iNOS nas lesões foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para estabelecer a correlação entre as citocinas do sobrenadante de cultura e das lesões cutâneas foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman. De modo semelhante, para correlacionar os resultados das citocinas nas lesões cutâneas e o número de bacilos álcool-ácido resistentes empregou-se o coeficiente de correlação de Spearman. Em todas as situações estudadas as estatísticas calculadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.⁽⁸⁴⁾

Resultados

A análise histológica dos cortes corados por HE revelou que pacientes BT apresentaram granulomas formados por células epitelióides no centro e halo linfohistiocitário na periferia. As células epitelióides formavam arranjo tuberculóide frouxo permeado por pequeno número de linfócitos. O halo periférico era constituído predominantemente por linfócitos e, em menor número, histiócitos e plasmócitos. Alguns granulomas apresentavam células gigantes tipo Langhans e tipo corpo estranho (Figura 2). Nos pacientes BL, os granulomas eram formados por histiócitos não-epitelióides permeados por linfócitos. Por vezes, havia aglomerados linfocitários ou dispostos em faixas sobre o infiltrado histiocitário (Figura 2).

O índice baciloscópico das lesões cutâneas nos pacientes estudados variou de 0 a 1+ (mediana 0) nos pacientes HDT e de 2 a 6+ (mediana 4+) nos HDV (Figuras 2 e 3).

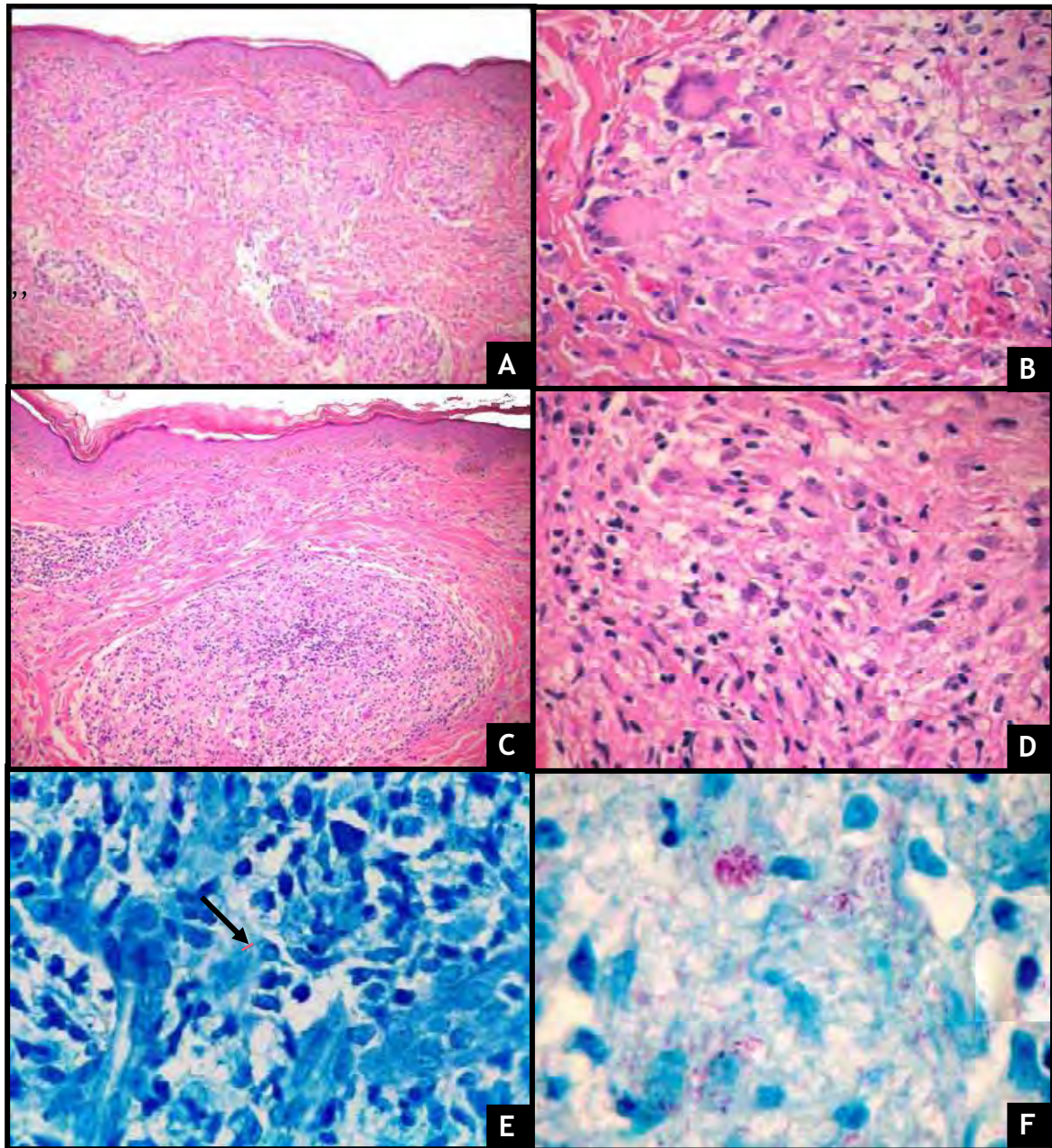


Figura 2. Lesão cutânea de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV). A.B. Granulomas de células epitelióides com halo linfocitário e presença de células gigantes multinucleadas - paciente HDT (HE, A: objetiva 10X; B: objetiva 40X). C.D. Granulomas compostos por histiócitos indiferenciados e infiltração linfocitária - paciente HDV (HE, C: objetiva 10X; D: objetiva 40X). E. raros bacilos presentes no infiltrado de paciente HDT (seta), F. muitos bacilos presentes no infiltrado de paciente HDV (Faraco-Fite, objetiva 100X)

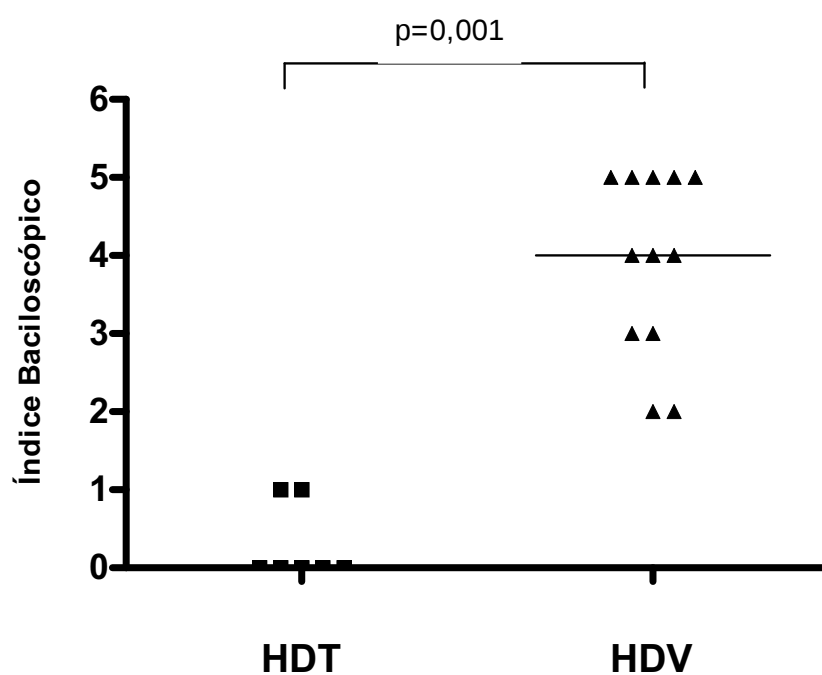


Figura 3. Índice baciloscópio das lesões cutâneas de pacientes HDT (n=7) e pacientes HDV (n=12). Os valores estão expressos de acordo com a classificação proposta por Ridley (1967) em escala de 0 - 6+ (Teste de Mann-Whitney).

4.1. Detecção das citocinas IL-10 e TGF- β 1 e da enzima iNOS nas lesões cutâneas.

Os resultados referentes à expressão das citocinas IL-10 e TGF- β 1 e da enzima iNOS em pacientes HDT e HDV estão sumarizados na Tabela 1 e Figura 4.

A imunomarcção para IL-10 foi detectada em células mononucleares, apresentando padrão granular, principalmente na periferia dos granulomas (Figura 5). A presença dessa citocina nas lesões dos pacientes, embora não significativa, foi mais evidente no grupo HDV (mediana 3+) que em pacientes HDT (mediana 2+).

A citocina TGF- β 1 foi detectada predominantemente em histiócitos de forma homogênea e difusa, principalmente nas lesões de pacientes HDV (mediana 3+). Nos pacientes HDT, essa citocina foi detectada em um número mínimo de células (mediana 1+) (Figura 6). A análise estatística revelou diferença significativa entre pacientes HTD e HDV ($p=0,033$).

A produção de iNOS foi significativamente maior em pacientes HDT (mediana 3+) que HDV (mediana 2+) ($p=0,043$). As células marcadas com iNOS foram histiócitos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas presentes nos granulomas (Figura 7).

Nos cortes histológicos empregados como controle negativo das colorações, isto é, nos cortes em que houve a omissão dos anticorpos primários e naqueles em que os anticorpos primários foram substituídos por soros normais de cabra e coelho, não encontramos nenhuma coloração. Também não houve coloração nos cortes de pele normal.

Quanto à correlação dos resultados nas diferentes formas clínicas, verificamos correlação negativa entre IL-10 e TGF- β 1 em pacientes HDV ($r=-0,68$; $p=0,03$). Nos demais parâmetros avaliados não houve correlação.

Independentemente da forma clínica, verificamos correlação positiva entre TGF- β 1 e índice baciloscópico ($r=0,563$; $p=0,029$) e correlação negativa entre TGF- β 1 e iNOS ($r=-0,705$; $p=0,002$) (Tabela 2).

Tabela 1. Detecção das citocinas IL-10 e TGF- β 1 e da enzima iNOS nas lesões cutâneas dos pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV).

Forma Clínica	marcadores		
	IL-10	TGF- β 1	iNOS
HDT (n=7)	2 (2;2)	1 (1;2)	3 (3;4)
HDV (n=12)	3 (2;3)	3 (2;3)	2 (1;3)
valor de p	0,230	0,033	0,043

Análise semiquantitativa (0 - 4+).

Os valores estão expressos em mediana e quartis (1º; 3º) (Teste de Mann-Whitney).

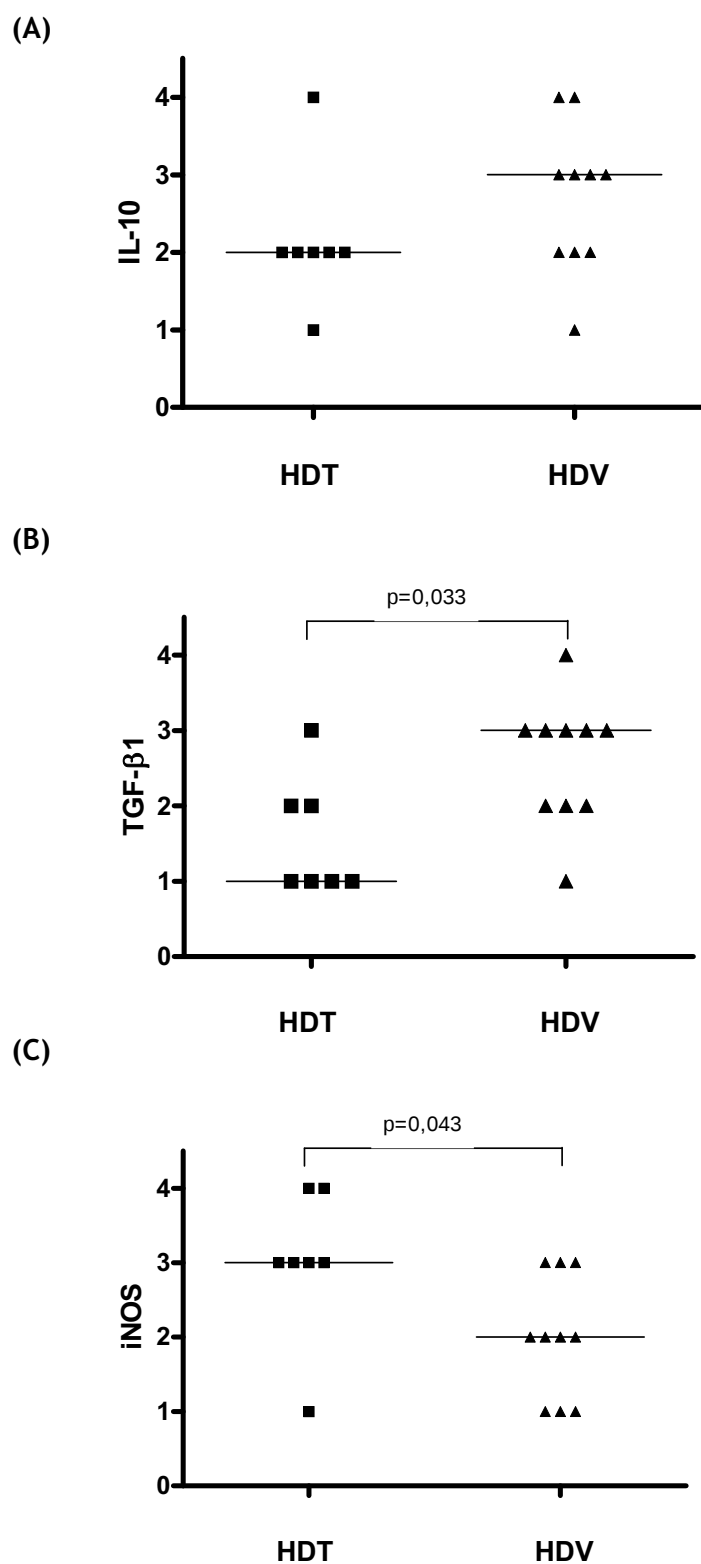


Figura 4. Distribuição dos valores semiquantitativos (0 - 4+) referentes à detecção de IL-10 (A), TGF-β1 (B) e iNOS (C) nas lesões cutâneas de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) (n=7) e dimorfa-virchoviana (HDV) (n=10) (Teste de Mann-Whitney).

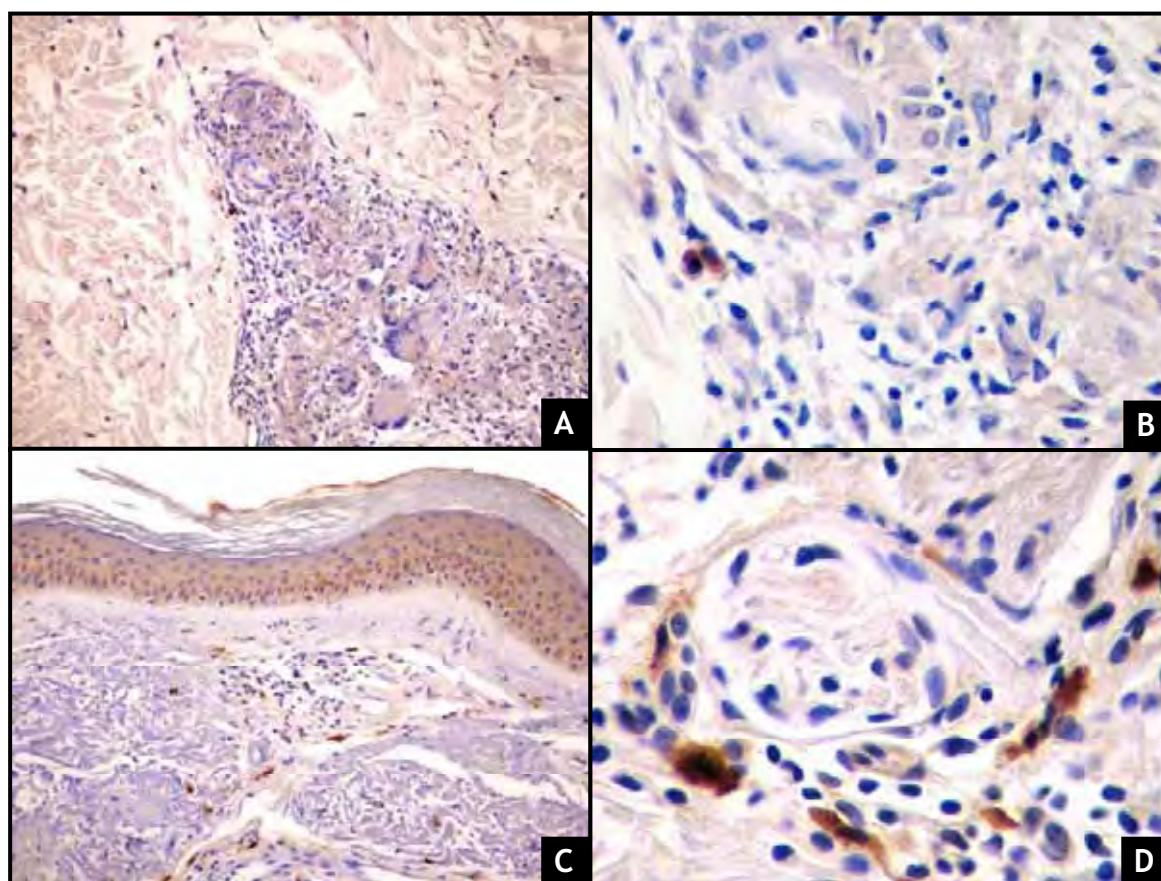


Figura 5. Imunomarcção da citocina IL-10 em cortes histológicos das lesões cutâneas de pacientes dimorfos-tuberculóides (A e B) e dimorfos-virchowianos (C e D). Células IL-10⁺ na periferia dos granulomas (Imunoistoquímica. A e C: objetiva 10X; B e D: objetiva 40X).

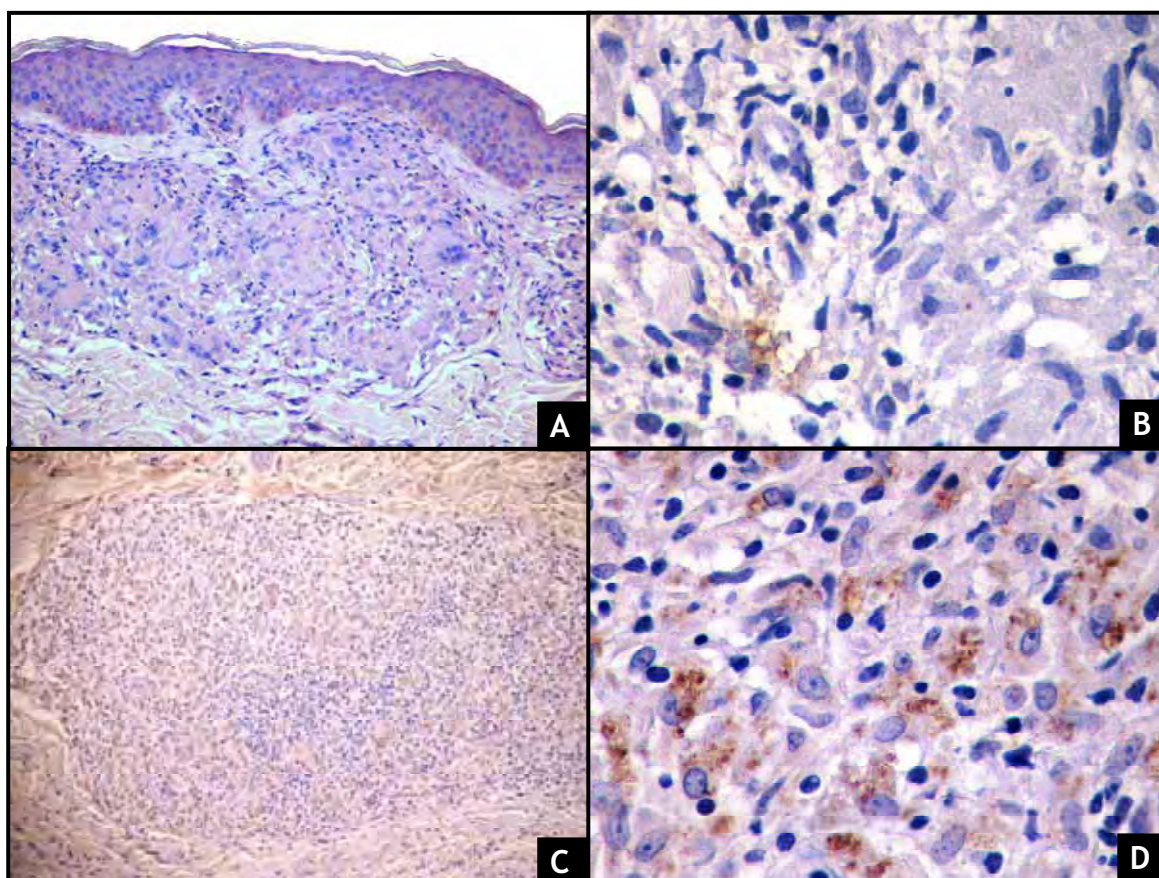


Figura 6. Imunomarcção da citocina TGF- β 1 em cortes histológicos de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (A.B.) e dimorfa-virchoviana (C.D.). Presença de histiócitos expressando TGF- β 1 (Imunoistoquímica. A e C: objetiva 10X; B e D: objetiva 40X).

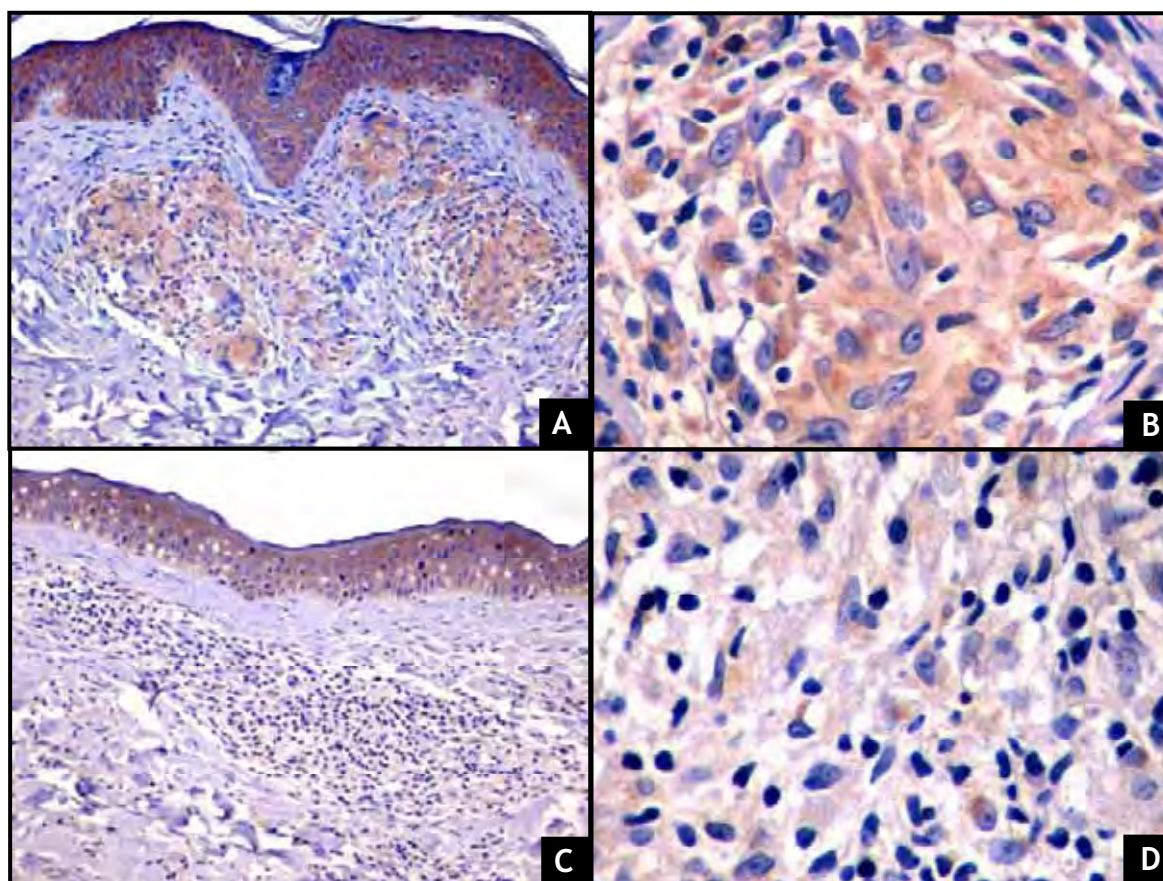


Figura 7. Imunomarcacão da enzima iNOS em cortes histológicos das lesões cutâneas de pacientes dimorfos-tuberculóides (HDT) (A e B) e dimorfos-virchowianos (HDV) (C e D). Histiócitos, células epitelióides e células gigantes multinucleadas iNOS⁺ - pacientes HDT. Número discreto de células iNOS⁺ - pacientes HDV (Imunoistoquímica. A e C: objetiva 10X; B e D: objetiva 40X).

Tabela 2. Resultados da correlação entre índice baciloscópico (IB), iNOS e as citocinas IL-10 e TGF- β 1 nas lesões dos pacientes com hanseníase dimorfa, independentemente da forma clínica.

Parâmetro		IB	iNOS	IL-10	TGF- β 1
IB	r		-0,310	0,333	0,563
	p		0,261	0,225	0,029 *
iNOS	r	-0,310		-0,193	-0,705
	p	0,261		0,458	0,002 **
IL-10	r	0,333	-0,193		-0,155
	p	0,225	0,458		0,552
TGF- β 1	r	0,563	-0,705	-0,155	
	p	0,029 *	0,002 **	0,552	

r = coeficiente de correlação (Correlação não paramétrica de Spearman).

* p < 0,05

** p < 0,01

4.2. Quantificação de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares

Os resultados da quantificação de citocinas foram analisados, primeiramente, para verificar diferenças na produção desses mediadores em cultura de células estimuladas com estímulos inespecíficos (PHA e LPS), específicos do *M. leprae* (integral e sonicado) e sem qualquer estímulo (produção espontânea). Posteriormente, os resultados foram analisados para verificar diferenças na quantificação de citocinas entre pacientes e grupo controle e, em seguida, entre pacientes HDT e HDV. Deste modo, os resultados da quantificação de citocinas serão subdivididos em: avaliação dos estímulos inespecíficos e específicos em cultura de células; grupo paciente x grupo controle e grupo HDT x grupo HDV.

4.2.1. Avaliação dos estímulos inespecíficos e específicos em cultura de células mononucleares

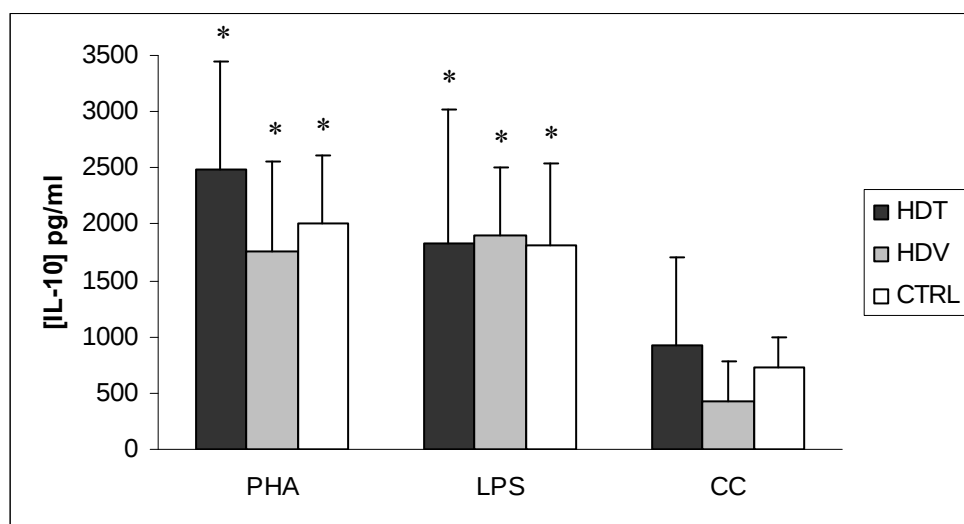
A produção de citocinas IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ foi maior em culturas estimuladas com PHA quando comparada às culturas não estimuladas ($p < 0,05$) (Figuras 8, 9 e 10). Do mesmo modo, a adição de LPS nas culturas resultou em produção mais elevada de citocinas IL-10, TGF- β 1 e TNF- α quando comparada com culturas sem estímulos (Figuras 8, 9 e 11).

Quanto aos estímulos específicos do *M. leprae*, empregamos o antígeno sonicado (AgSon) e o antígeno inteiro nas concentrações de 2 bacilos:célula (Ag2) e 8 bacilos:célula (Ag8). Tanto o Ag8 como o AgSon induziram, de modo

semelhante ao LPS, maior produção de IL-10, TGF- β 1 e TNF- α quando comparado à cultura espontânea nos grupos avaliados (Figuras 8, 9 e 11 e Tabela 3). Com relação ao Ag2, houve maior produção de TGF- β 1 em todos os grupos; entretanto a produção de TNF- α foi maior no grupo HDV e controle, enquanto a IL-10 foi maior somente no grupo controle (Figuras 8, 9 e 11 e Tabela 3).

Embora os antígenos específicos do bacilo tenham estimulado a produção de IFN- γ em níveis maiores que a cultura não estimulada (produção espontânea), principalmente nos pacientes HDT, a análise estatística dos resultados não revelou diferença significativa (Figura 10 e Tabela 3).

(A)



(B)

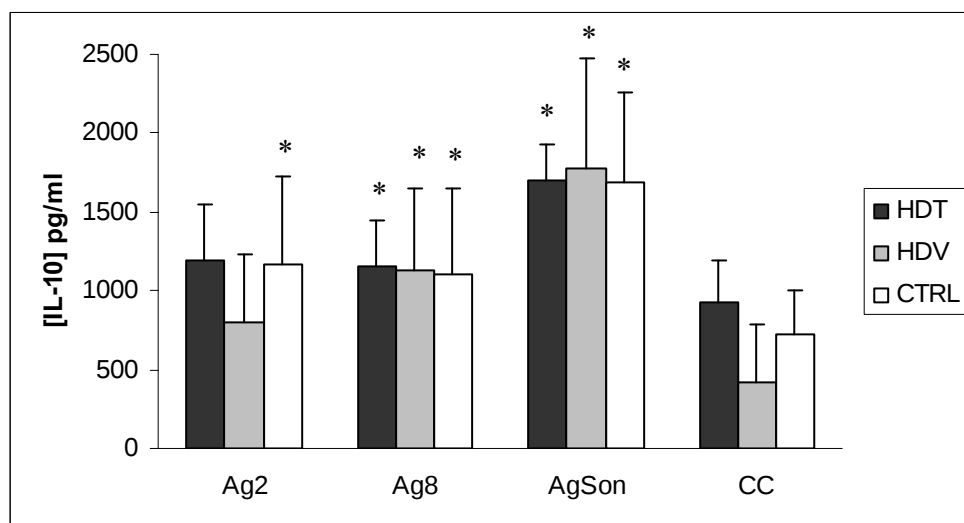
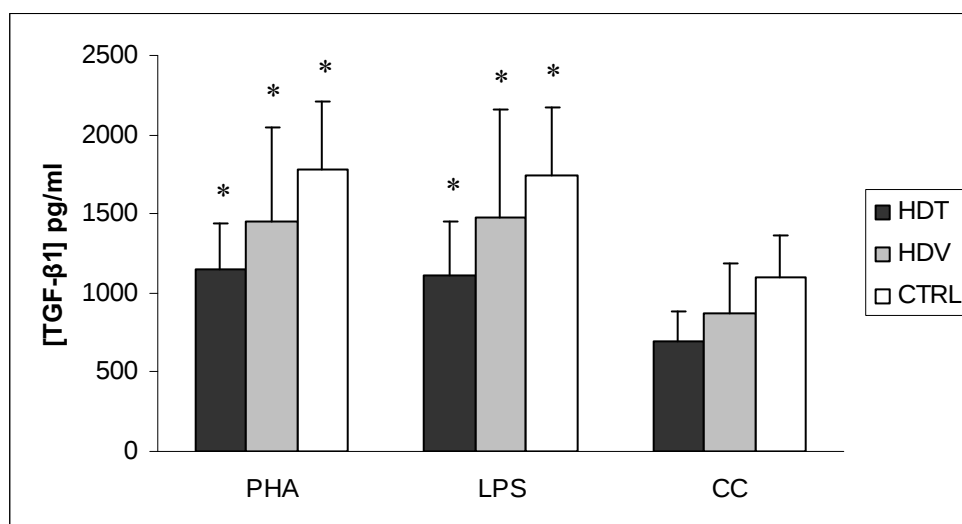


Figura 8. Quantificação dos níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). A. Estímulos inespecíficos. B. Estímulos específicos do *M. leprae*. * diferença estatisticamente significativa entre estímulos e produção espontânea (CC) (ANOVA, pós-teste de Tukey; $p < 0,05$).

(A)



(B)

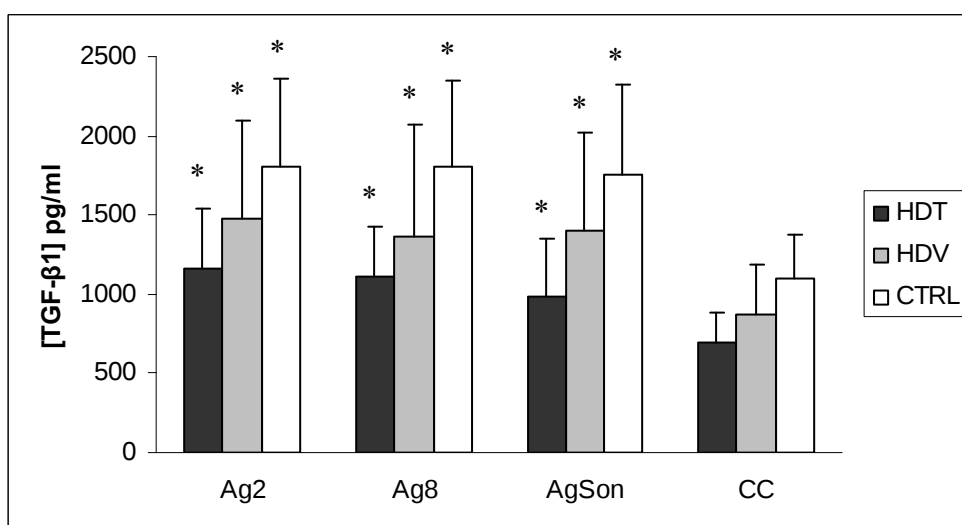
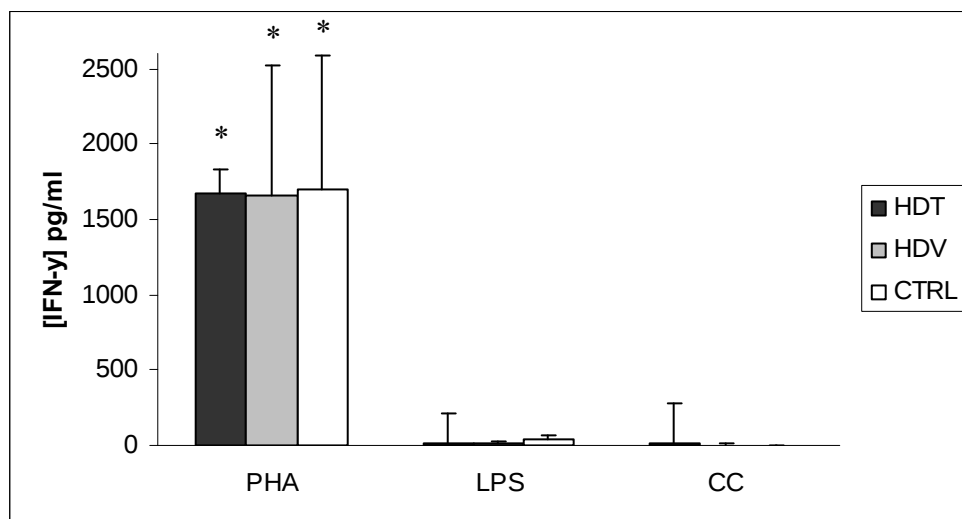


Figura 9. Quantificação dos níveis de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). **A.** Estímulos inespecíficos. **B.** Estímulos específicos do *M. leprae*. * diferença estatisticamente significativa entre estímulos e produção espontânea (CC) (ANOVA, pós-teste de Tukey; $p < 0,05$).

(A)



(B)

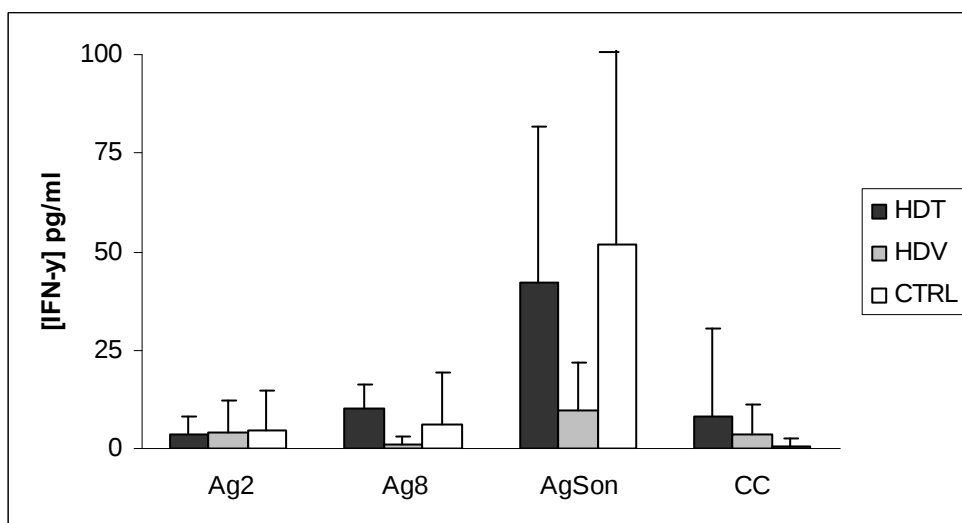
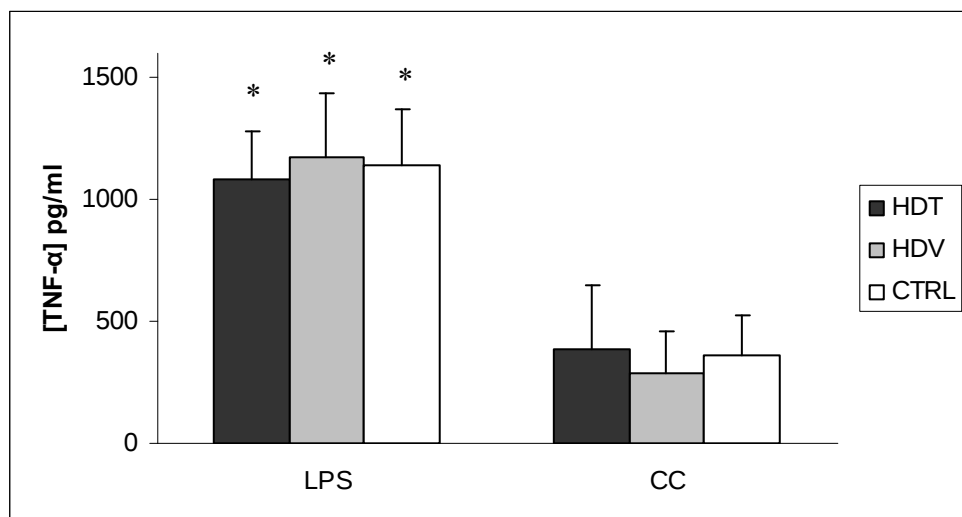


Figura 10. Quantificação dos níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). A. Estímulos inespecíficos. B. Estímulos específicos do *M. leprae*. * diferença estatisticamente significativa entre estímulos e produção espontânea (CC) (ANOVA, pós-teste de Tukey; $p < 0,05$).

(A)



(B)

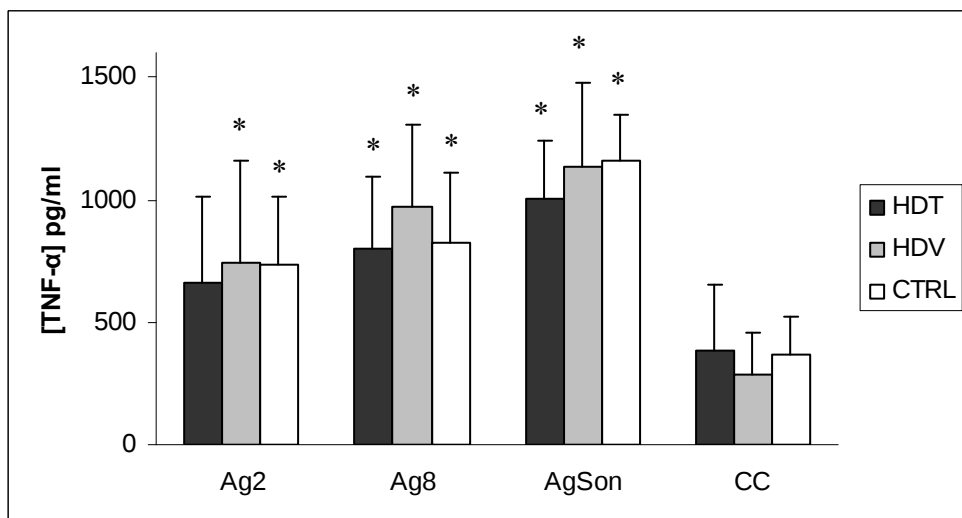


Figura 11. Quantificação dos níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). **A.** Estímulos inespecíficos. **B.** Estímulos específicos do *M. leprae*. * diferença estatisticamente significativa entre estímulos e produção espontânea (CC) (ANOVA, pós-teste de Tukey; $p < 0,05$).

Tabela 3. Avaliação dos antígenos específicos do *M. leprae* com relação à produção de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL).

Estímulos	Citocina	HDT	HDV	CTRL
Ag2 X CC	TNF- α	NS	p<0,05	p<0,05
	IFN- γ	NS	NS	NS
	IL-10	NS	NS	p<0,05
	TGF- β 1	p<0,05	p<0,05	p<0,05
Ag8 X CC	TNF- α	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	IFN - γ	NS	NS	NS
	IL-10	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	TGF- β 1	p<0,05	p<0,05	p<0,05
AgSon X CC	TNF- α	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	IFN - γ	NS	NS	NS
	IL-10	p<0,05	p<0,05	p<0,05
	TGF- β 1	p<0,05	p<0,05	p<0,05

NS = não significativo
(ANOVA, com pós-teste de Tukey)

4.2.2. Grupo Paciente X Grupo Controle

A produção de TNF- α e IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares, independentemente de estímulos, não foi estatisticamente significativa entre os pacientes HDT/HDV e os respectivos controles (Tabelas 4 e 5; Figuras 12, 13, 14 e 15).

Do mesmo modo, os níveis de IL-10 nos sobrenadantes de cultura também não foram significantes entre pacientes e grupo controle, exceto uma significativa diminuição ($p=0,006$) na produção espontânea de IL-10 em pacientes HDV (Tabela 5; Figuras 16 e 17).

Com relação à produção de TGF- β 1, pacientes HDT em comparação com seu grupo controle exibiram menor produção dessa citocina na cultura estimulada com PHA ($p=0,045$) e na cultura não estimulada ($p=0,015$) (Tabela 4 e Figura 18). Pacientes HDV exibiram menor produção de TGF- β 1 nas culturas estimuladas com PHA ($p=0,048$) e Ag8 ($p=0,049$) (Tabela 5 e Figura 19).

Tabela 4. Quantificação de IFN- γ , IL-10, TGF- β 1 e TNF- α (pg/ml) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Estímulo	IFN- γ		IL-10		TGF- β 1		TNF- α	
	HDT	CTRL	HDT	CTRL	HDT	CTRL	HDT	CTRL
PHA	1677,1 $\pm$ 1006,1*	1832,9 $\pm$ 993,1*	2494,0 $\pm$ 960,2*	1600,6 $\pm$ 519,9	1147,5 $\pm$ 287,1* Δ	1597 $\pm$ 377,5* Δ	1162,2 $\pm$ 148,2*	1475,3 $\pm$ 168,1*
LPS	9,8 $\pm$ 15,1	36,3 $\pm$ 35,8	1829,8 $\pm$ 1184,7*	1483 $\pm$ 696,2*	1106,6 $\pm$ 346,5*	1654,6 $\pm$ 517,7*	1079,6 $\pm$ 201,9*	1111,6 $\pm$ 240,4*
Ag2	3,4 $\pm$ 4,9	4,9 $\pm$ 8,2	1197,4 $\pm$ 962,9*	971,7 $\pm$ 612,7*	1160,3 $\pm$ 378,8*	1653 $\pm$ 489*	662 $\pm$ 349,7*	670 $\pm$ 288,2*
Ag8	10,0 $\pm$ 6,4	10,8 $\pm$ 21	1150,4 $\pm$ 830,8*	973,1 $\pm$ 676,8*	1105,6 $\pm$ 321,4*	1696 $\pm$ 569,8*	800,3 $\pm$ 297,4*	789,6 $\pm$ 323,2*
AgSon	42,0 $\pm$ 39,8	116,8 $\pm$ 189,9	1695,2 $\pm$ 925,1*	1309,4 $\pm$ 482*	980,5 $\pm$ 365,2*	1564,2 $\pm$ 684,4*	1005,4 $\pm$ 238,2*	1091,4 $\pm$ 215,4*
CC	8,3 $\pm$ 22,0	1,3 $\pm$ 3,5	929,2 $\pm$ 781,2	575,4 $\pm$ 308,0	700,4 $\pm$ 189,5 Δ	1034,4 $\pm$ 223 Δ	383,4 $\pm$ 266,3	364,1 $\pm$ 150,0

* diferença significativa entre estímulos e produção espontânea (CC) (p<0.05)

Tabela 5. Quantificação de IFN- γ , IL-10, TGF- β 1 e TNF- α (pg/ml) em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com Hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Estímulo	IFN- γ		IL-10		TGF- β 1		TNF- α	
	HDV	CTRL	HDV	CTRL	HDV	CTRL	HDV	CTRL
PHA	1658,2 $\pm$ 866,1*	1624,9 $\pm$ 886,2*	1760,8 $\pm$ 805,8*	2252,7 $\pm$ 565,9*	1447,8 $\pm$ 597,8* $\blacktriangle$	1894,1 $\pm$ 432,2* $\blacktriangle$	1259,3 $\pm$ 232,1*	1226,7 $\pm$ 216,6*
LPS	9,1 $\pm$ 19,7	32,3 $\pm$ 42,3	1898,7 $\pm$ 614,9*	2010,3 $\pm$ 736,8*	1472,7 $\pm$ 688,2*	1795,2 $\pm$ 410,3*	1174,8 $\pm$ 261,1*	1161,1 $\pm$ 238,7*
Ag2	4,0 $\pm$ 8,4	4,0 $\pm$ 11,9	795,5 $\pm$ 432,7*	1279,9 $\pm$ 546,3*	1479,4 $\pm$ 613,5*	1890,6 $\pm$ 528,3*	744,2 $\pm$ 411,4*	772,5 $\pm$ 290,5*
Ag8	1,1 $\pm$ 1,9	3,5 $\pm$ 5,0	1127,6 $\pm$ 517,3*	1184,7 $\pm$ 490,5*	1365,0 $\pm$ 699,8* $\blacktriangle$	1873,6 $\pm$ 477,6* $\blacktriangle$	972,4 $\pm$ 333,2*	844,6 $\pm$ 291,6*
AgSon	9,6 $\pm$ 12,2	13,9 $\pm$ 14,1	1778,9 $\pm$ 692,9*	1908,4 $\pm$ 535,5*	1406,8 $\pm$ 614,5*	1873,2 $\pm$ 510,9*	1137,0 $\pm$ 342,2*	1204,7 $\pm$ 174,4*
CC	3,8 $\pm$ 7,3	0,1 $\pm$ 0,2	419,6 $\pm$ 364,1 $\blacktriangle$	809,6 $\pm$ 247,2 $\blacktriangle$	875,4 $\pm$ 308,5	1137,8 $\pm$ 302,1	284,3 $\pm$ 174,2	360,2 $\pm$ 180,9

* diferença significativa entre estímulos e produção espontânea (CC) (p<0,05)

$\blacktriangle$ diferença significativa entre HDT e CTRL (p<0,05)

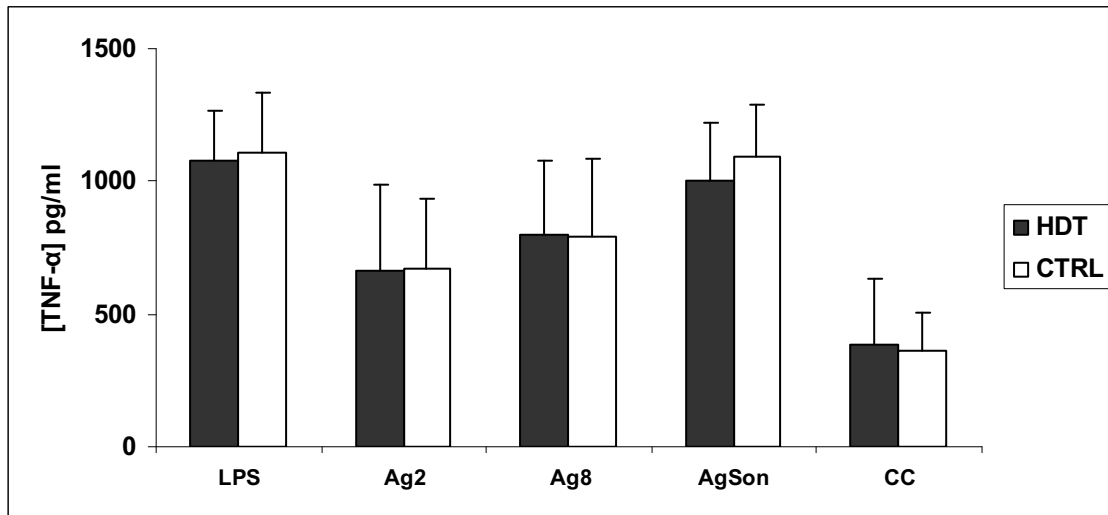


Figura 12. Quantificação dos níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (teste T de Student; n=7).

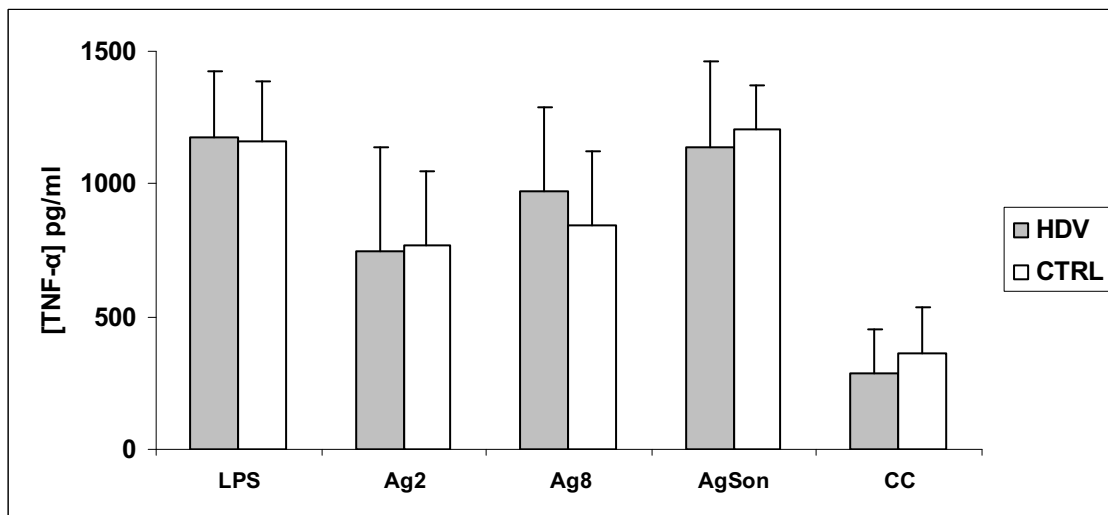


Figura 13. Quantificação dos níveis de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (teste T de Student; n=12).

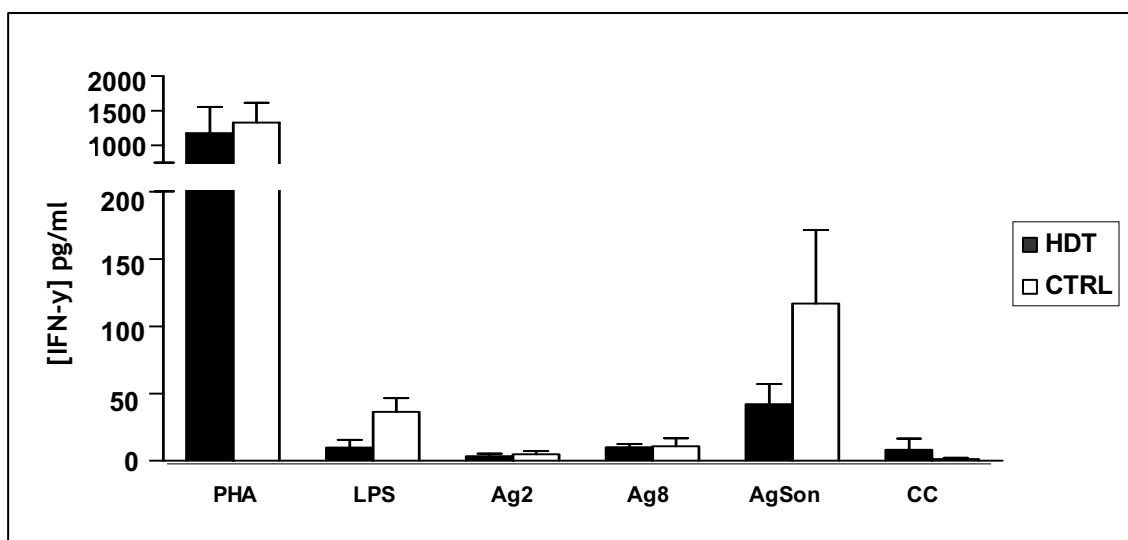


Figura 14. Quantificação dos níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (teste T de Student; n=7).

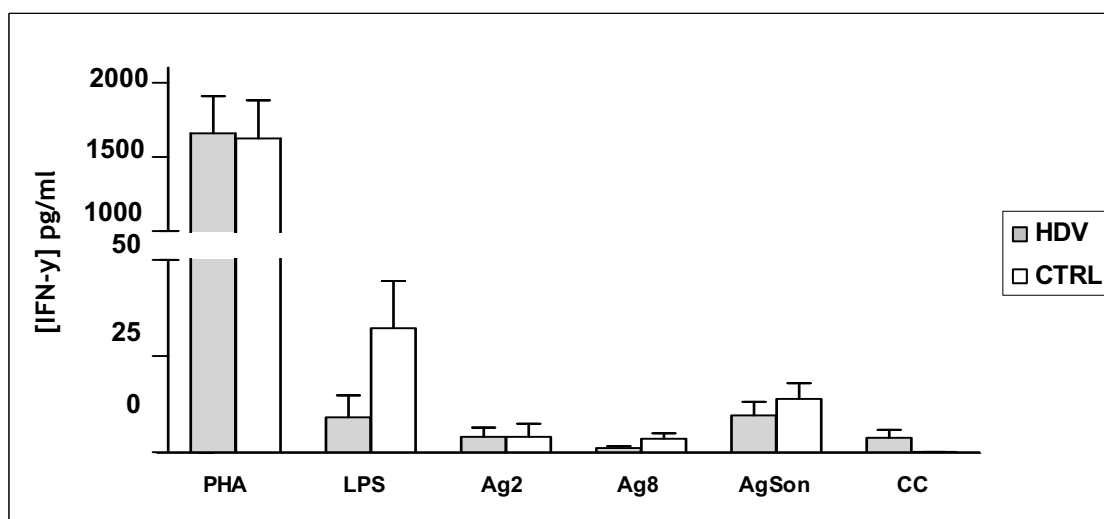


Figura 15. Quantificação dos níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (teste T de Student; n=12).

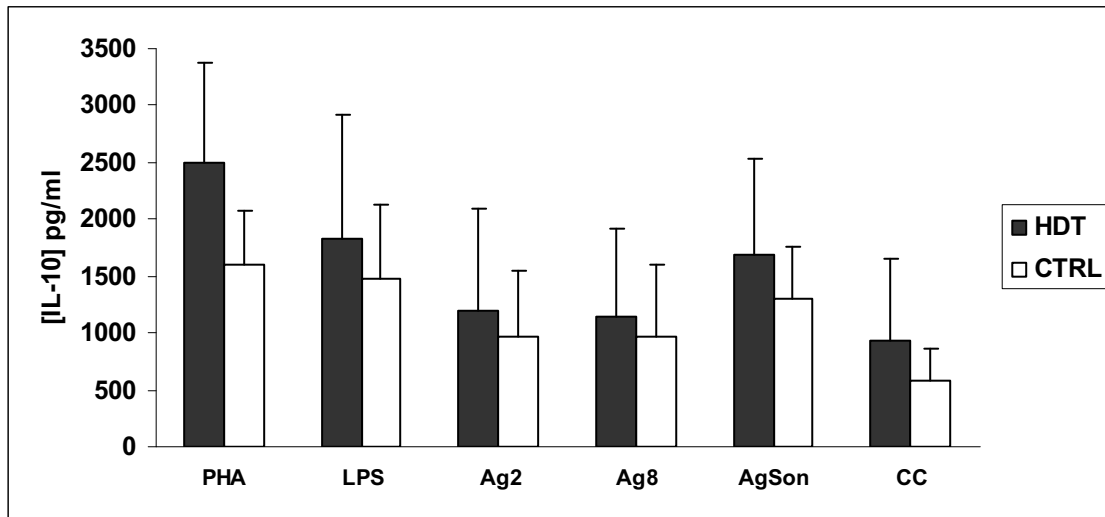


Figura 16. Quantificação dos níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (teste T de Student; $n=7$).

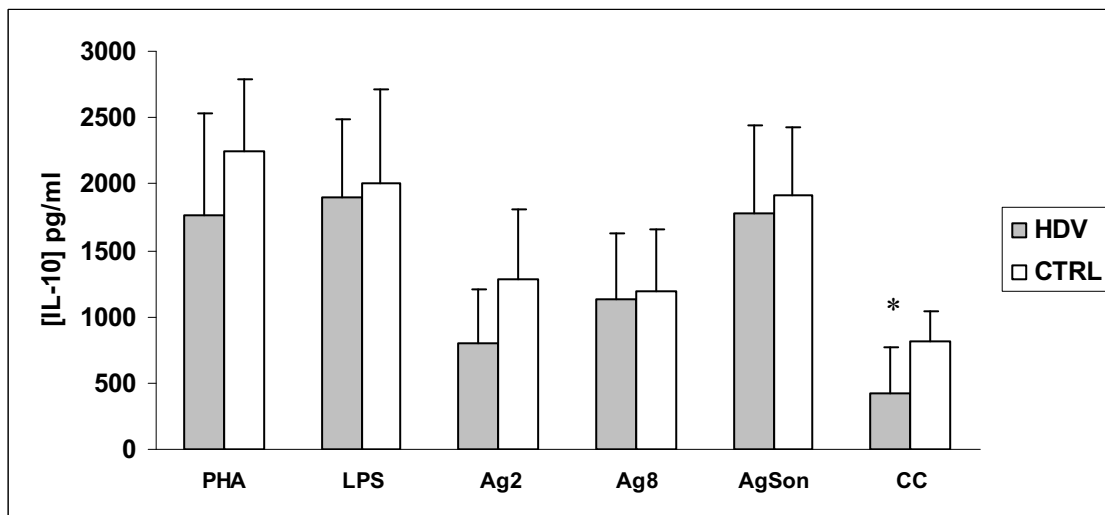


Figura 17. Quantificação dos níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (* $p < 0,05$; teste T de Student; $n=12$).

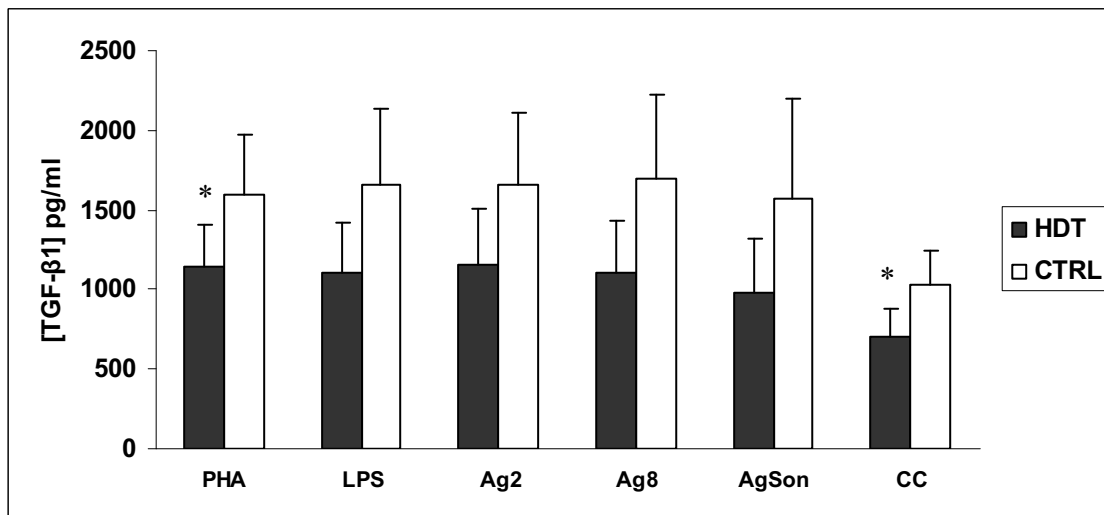


Figura 18. Quantificação dos níveis de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (* $p < 0,05$; teste T de Student; $n=7$).

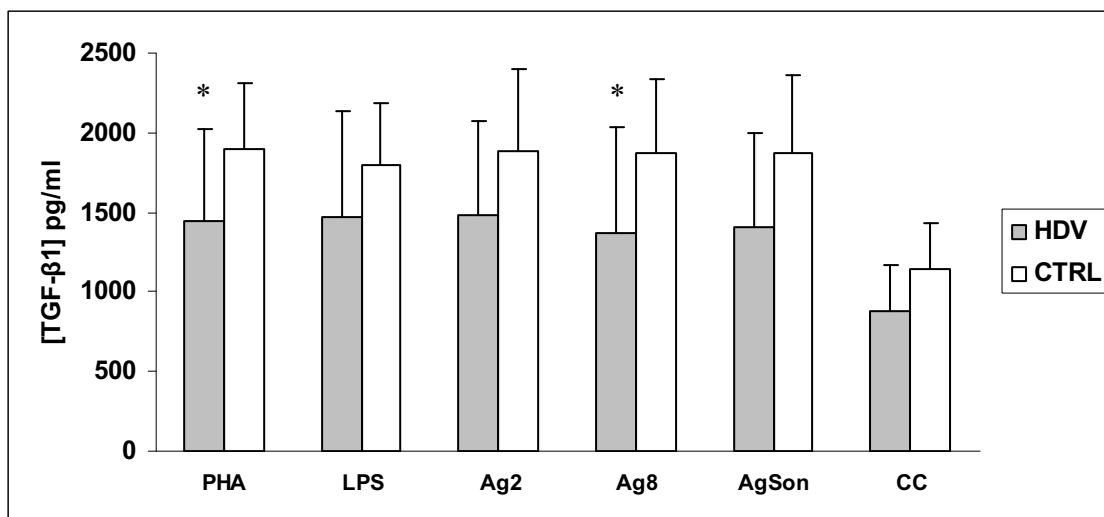


Figura 19. Quantificação dos níveis de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV) e grupo controle (CTRL). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (* $p < 0,05$; teste T de Student; $n=12$).

4.2.3. Grupo HDT X Grupo HDV

A produção de INF- γ foi estatisticamente maior nos pacientes HDT em comparação com pacientes HDV nas culturas estimuladas com Ag8 e AgSon (Tabela 6 e Figura 20).

A produção das citocinas TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares, independentemente dos estímulos, não foi estatisticamente significante entre os grupos HDT e HDV (Tabela 6 e Figuras 21, 22 e 23).

Tabela 6. Quantificação de IFN- γ , IL-10, TGF- β 1 e TNF- α (pg/ml) em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e dimorfa-virchoviana (HDV). Os valores estão expressos em média $\pm$ desvio padrão.

Estímulo	IFN- γ		IL-10		TGF- β 1		TNF- α	
	HDT	HDV	HDT	HDV	HDT	HDV	HDT	HDV
PHA	1677,1 $\pm$ 1006,1*	1658,2 $\pm$ 866,1*	2494,0 $\pm$ 960,2*	1760,8 $\pm$ 805,8*	1147,5 $\pm$ 287,1*	1447,8 $\pm$ 597,8*	1162,2 $\pm$ 148,2*	1259,3 $\pm$ 232,1*
LPS	9,8 $\pm$ 15,1	9,1 $\pm$ 19,7	1829,8 $\pm$ 1184,7*	1898,7 $\pm$ 614,9*	1106,6 $\pm$ 346,5*	1472,7 $\pm$ 688,2*	1079,6 $\pm$ 201,9*	1174,8 $\pm$ 261,1*
Ag2	3,4 $\pm$ 4,9	4,0 $\pm$ 8,4	1197,4 $\pm$ 962,9*	795,5 $\pm$ 432,7*	1160,3 $\pm$ 378,8*	1479,4 $\pm$ 613,5*	662,0 $\pm$ 349,7*	744,2 $\pm$ 411,4*
Ag8	10,0 $\pm$ 6,4 [▲]	1,1 $\pm$ 1,9 [▲]	1150,4 $\pm$ 830,8*	1127,6 $\pm$ 517,3*	1105,6 $\pm$ 321,4*	1365,0 $\pm$ 699,8*	800,3 $\pm$ 297,4*	972,4 $\pm$ 333,2*
Ag Son	42,0 $\pm$ 39,8 [▲]	9,6 $\pm$ 12,2 [▲]	1695,2 $\pm$ 925,1*	1778,9 $\pm$ 692,9*	980,5 $\pm$ 365,2*	1406,8 $\pm$ 614,5*	1005,4 $\pm$ 238,2*	1137,0 $\pm$ 342,2*
CC	8,3 $\pm$ 22,0	3,8 $\pm$ 7,3	929,2 $\pm$ 781,2	419,6 $\pm$ 364,1	700,4 $\pm$ 189,5	875,4 $\pm$ 308,5	383,4 $\pm$ 266,3	284,3 $\pm$ 174,2

* diferença significativa entre estímulos e produção espontânea (CC) (p<0,05)

▲ diferença significativa entre BT e BL (p<0,05)

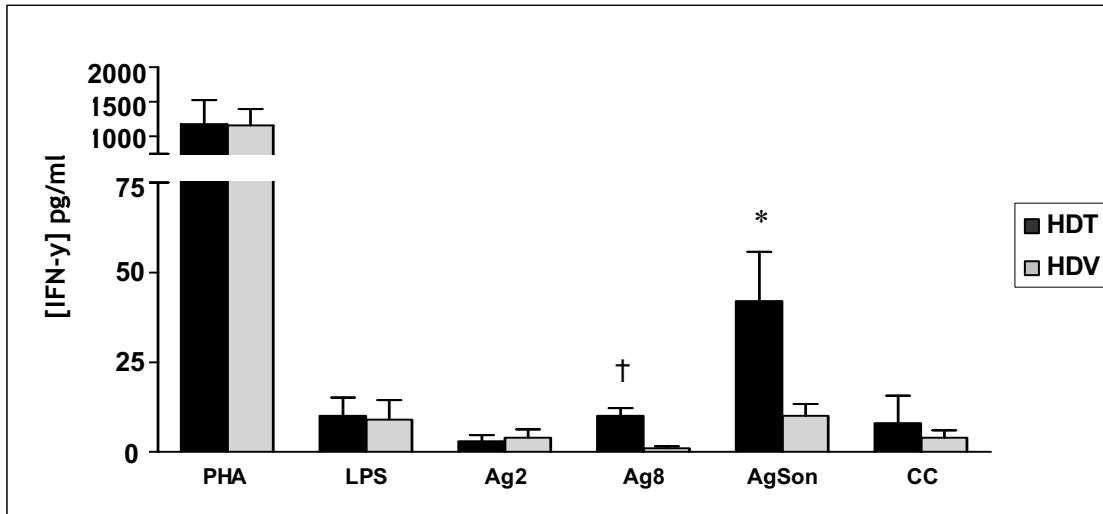


Figura 20. Quantificação dos níveis de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT, n=7) e dimorfa-virchoviana (HDV, n=12). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (* $p < 0,05$; † $p < 0,001$; teste T de Student).

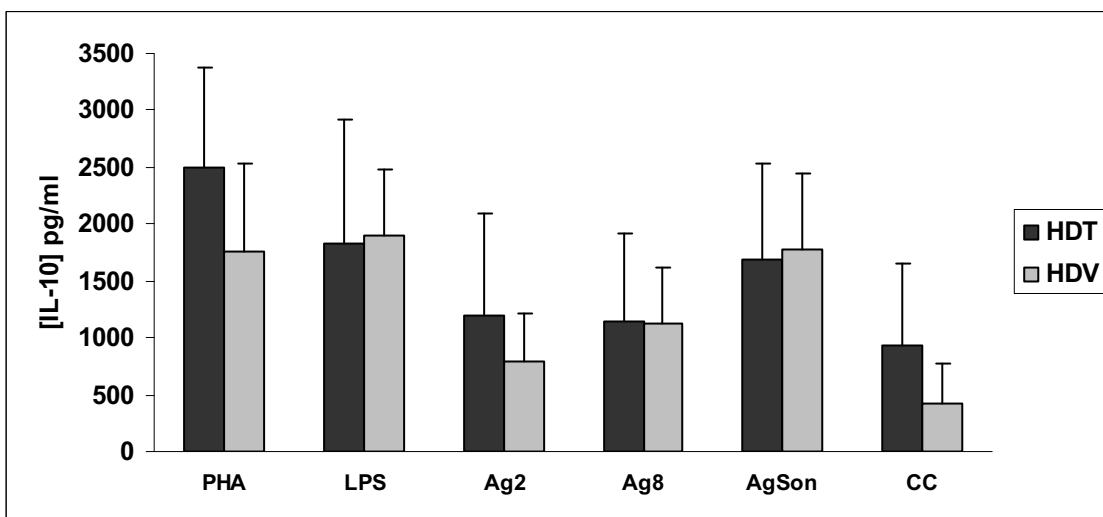


Figura 21. Quantificação dos níveis de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT, n=7) e dimorfa-virchoviana (HDV, n=12). Os valores estão expressos em média $\pm$ DP (teste T de Student).

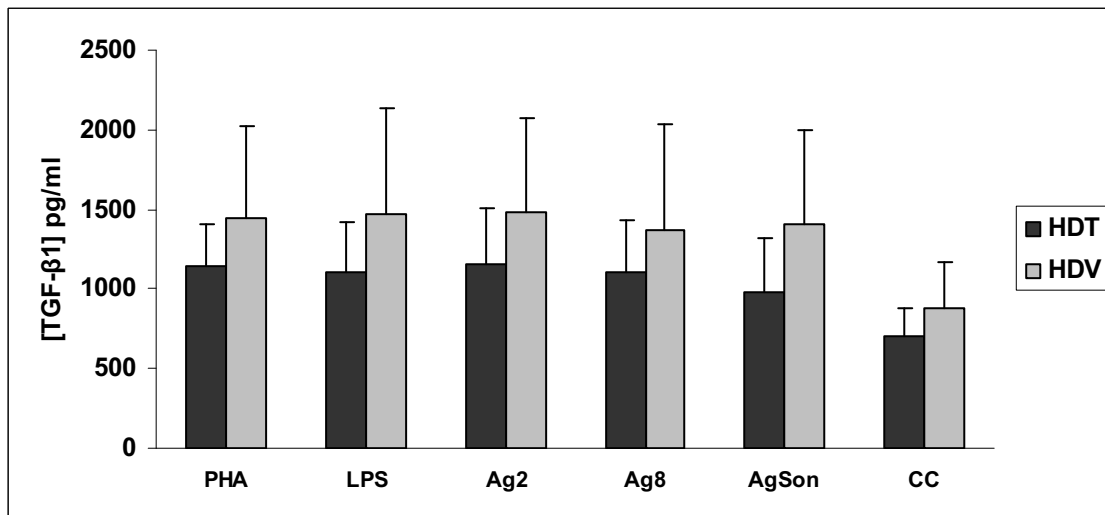


Figura 22. Quantificação dos níveis de TGF-β1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT, n=7) e dimorfa-virchoviana (HDV, n=12). Os valores estão expressos em média ± DP (teste T de Student).

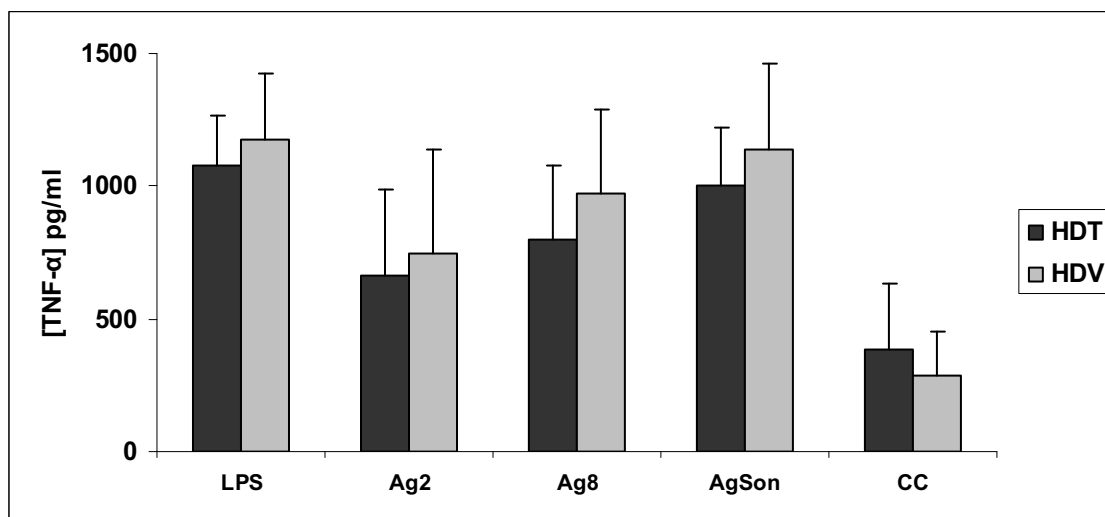


Figura 23. Quantificação dos níveis de TNF-α em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT, n=7) e dimorfa-virchoviana (HDV, n=12). Os valores estão expressos em média ± DP (teste T de Student).

4.3. Correlação entre a produção de citocinas *in vitro* e *in situ*

No presente estudo, avaliamos a possível correlação entre a produção das citocinas IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1 no sobrenadante de cultura de células mononucleares, estimuladas com antígenos do *M. leprae*, e a produção de iNOS, IL-10 e TGF- β 1 na lesão cutânea dos pacientes.

Os resultados demonstraram correlação positiva entre a produção de IFN- γ em sobrenadante de cultura estimulada com AgSon e a expressão de iNOS no tecido ($r = 0,55$; $p=0,027$) (Figura 24). Nos demais parâmetros avaliados não houve correlação.

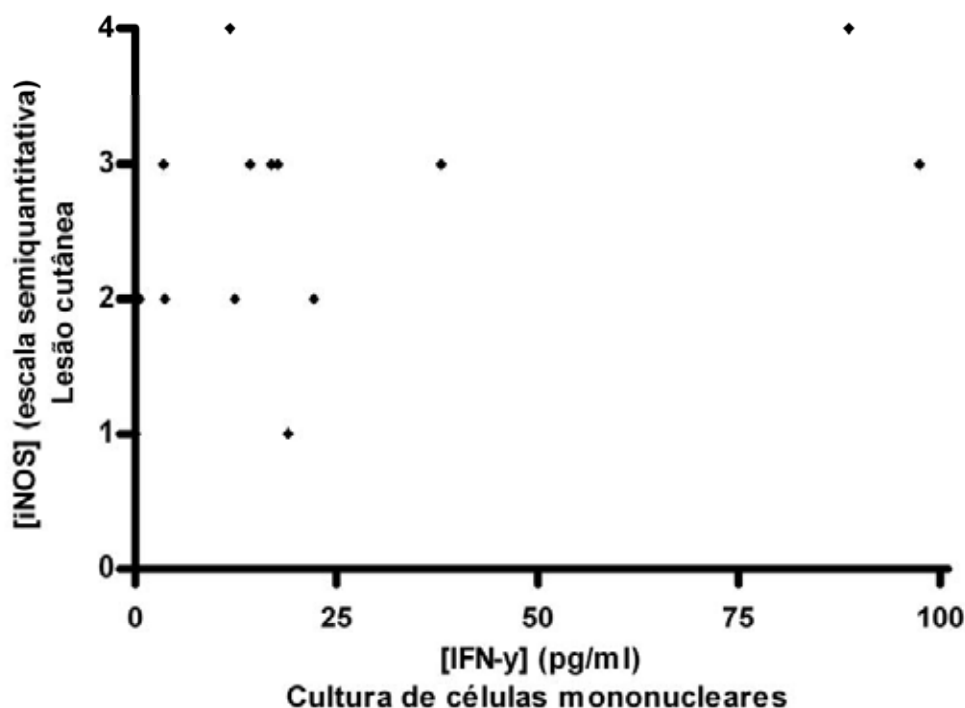


Figura 24. Correlação entre a produção de IFN- γ no sobrenadante de cultura de células mononucleares e a expressão de iNOS na lesão cutânea de pacientes com hanseníase dimorfa. Teste de Correlação de Spearman ($r = 0,55$; $p=0,027$).

Discussão

Os estudos envolvendo a participação de citocinas na resposta imune de pacientes dimorfos são pouco enfocados, deste modo investigamos a produção desses mediadores *in vitro* e *in situ* visando contribuir para o melhor entendimento da relação hospedeiro-parasita. De modo geral, esse aspecto encontra-se bem caracterizado nas manifestações polares da doença. No pólo de maior resistência, observa-se aumento de IL-2, INF- γ e TNF- α e no pólo oposto, aumento de IL-4, IL-5 e IL-10.^(41,53,54,57-60) No grupo dimorfo, entretanto, os resultados são escassos, e em geral, os pesquisadores enfocam a presença de mediadores ora no sangue periférico, ora na lesão cutânea, não existindo nenhum estudo onde esses dois aspectos foram avaliados e correlacionados. Além disso, frequentemente, os pacientes HDV ou HDT são caracterizados por meio de comparações com as formas polares e, nem sempre, a amostragem é representativa. Aliado a isso, não encontramos na literatura, trabalhos que avaliam o perfil de várias citocinas em todos os pacientes, ou seja, estuda-se uma ou outra citocina, dificultando os estudos comparativos dos diferentes perfis da resposta imune. Assim, investigamos as principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória (TNF- α e TGF- β 1) e resposta imune linfocitária de perfis Th1 (INF- γ), Th2 (IL-10) e Th3 (IL-10 e TGF- β 1).

5.1. Perfil de citocinas no sobrenadante de cultura de células mononucleares

No presente estudo avaliamos o perfil imunogênico de 2 antígenos do *M. leprae*. O antígeno integral, contendo componentes lipídicos e protéicos da parede celular do bacilo, foi avaliado em duas concentrações: 2 bacilos:célula (Ag2) e 8 bacilos:célula (Ag8). O antígeno sonificado (Ag Son), composto por proteínas citosólicas e componentes da parede celular liberados durante a ruptura do bacilo, foi avaliado na concentração de 10 ug/ml. Tanto o antígeno íntegro quanto o antígeno sonificado tem sido empregado para estimular a produção de citocinas em culturas de PBMC. Na literatura consultada verificamos que a concentração utilizada do AgSon é, de modo geral, 10 ug/ml com bons resultados;^(77,87-90) entretanto a concentração do antígeno inteiro do *M. leprae* é variável,^(78,86,91-94) deste modo resolvemos empregar este antígeno em 2 concentrações diferentes: 1ug (2 bacilos:célula) e 4 ug (8 bacilos:célula).

Em comparação com a produção espontânea (culturas sem estímulos), tanto o Ag8 quanto o AgSon estimularam maior produção das citocinas TNF- α , IL-10 e TGF- β 1; enquanto a adição do Ag2 nas culturas, não estimulou a produção dessas citocinas. No entanto, os antígenos não foram capazes de elevar significativamente a produção de IFN- γ , embora níveis maiores dessa citocina foram observados nos pacientes HDT.

O fato do *M. leprae* não ser cultivado *in vitro* tem dificultado a pesquisa de antígenos específicos e o seu emprego como estímulos em cultura de células. Diversos pesquisadores têm demonstrado que antígenos da parede

celular do bacilo, como o LAM e o PGL-I, suprimem a proliferação de linfócitos T, a ativação de macrófagos e as suas funções efectoras⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾. Nakamura et al.⁽⁹⁸⁾ verificaram que quando os antígenos lipídicos da parede celular do bacilo eram removidos, a produção das citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 aumentava significativamente.

Atualmente, com o domínio de técnicas de biologia molecular, essas dificuldades vêm sendo superadas e antígenos purificados capazes de estimular a produção *in vitro* de citocinas estão sendo produzidos.^(28,32,88) No entanto, os resultados obtidos podem variar de estudo para estudo, pois não dependem somente da qualidade do antígeno de escolha, mas também de outros parâmetros como a concentração antigênica, o tipo celular empregado, a concentração celular e o tempo de incubação. Por exemplo, Matos et al.⁽⁸⁶⁾, utilizaram 10^6 PBMC/ml estimuladas com AgSon (50ug/ml) e analisaram a produção de citocinas em diversos tempos; no primeiro dia, avaliaram a produção de TNF- α e no 2º, 3º e 5º dia, a produção de IL-5, IL-10 e INF- γ , respectivamente. Kang et al.⁽⁹⁴⁾ dosaram IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TNF- α e INF- γ utilizando antígeno íntegro (10 bacilos:célula), 2×10^7 células/ml e 18 horas de incubação. Manandhar et al.⁽⁹⁰⁾ utilizaram sangue total incubado com antígenos inteiro (10 ug/ml) e sonicado (10 ug/ml) por 24 horas. Em conjunto esses estudos apontam claramente para a necessidade de uma padronização metodológica dos estudos *in vitro*.

Cabe ressaltar também, que cada citocina apresenta um tempo ótimo para sua produção dentro da cinética da cultura celular. Citocinas inflamatórias são produzidas nas primeiras horas de incubação, enquanto que

IL-10 e INF- γ são secretadas mais tardiamente.⁽⁹⁹⁾ A nossa opção por 48 horas de incubação se alicerça no fato de que diversos estudos têm utilizado esse período para a dosagem das citocinas TNF- α , IL-10, IFN- γ e TGF- β 1, bem como pelo fato de termos como objetivo a análise simultânea das diversas citocinas *in vitro* e também *in situ*.^(88,100,101) Embora os antígenos utilizados não tenham sido eficientes em estimular uma produção elevada de IFN- γ , os níveis dessa citocina em geral foram sempre maiores que a produção espontânea. Diversos estudos têm demonstrado produção consistente de IFN- γ em culturas estimuladas com antígenos do *M. leprae* aumentando o período de incubação para 5 dias.^(87-89,102)

Em conjunto nossos resultados sugerem que os antígenos inteiro (Ag8) e sonicado são bons produtores de citocinas às 48 horas e podem ser empregados para ensaios *in vitro* da resposta imune.

A quantificação de citocinas em sobrenadante de PBMC dos pacientes revelou que os HDT produziram níveis maiores de IFN- γ em culturas estimuladas com os Ag8 e AgSon, em comparação aos pacientes HDV; entretanto não obtivemos diferenças significativas quanto ao TNF- α , IL-10 e TGF- β 1.

A citocina IFN- γ é produzida principalmente por linfócitos Th1, podendo ser também sintetizada por linfócitos T CD8⁺, células NK, monócitos e macrófagos.⁽¹⁰³⁾ Essa citocina se liga à receptores IFN- γ R1/R2 nos fagócitos mononucleares e juntamente com outros fatores, como por exemplo o TNF- α , ativa mecanismos microbicidas dessas células. Essa combinação sinérgica compreende o principal mecanismo efetor da resposta imune celular.⁽¹⁰³⁾

Na hanseníase, assim como em outras micobacterioses e micoses profundas, uma resposta imune celular (RIC) efetiva promove a contenção e eliminação do agente etiológico através de lesões granulomatosas bem organizadas.^(104,105) No pólo tuberculóide da hanseníase, as células Th1 ativadas promovem uma intensa RIC.^(87,89) No entanto, alguns pacientes freqüentemente falham na organização deste granuloma quando expostos ao bacilo; esses pacientes compreendem o outro pólo do espectro da hanseníase, os virchovianos.⁽¹⁰⁶⁾ Assim, tem sido bem documentada a produção *in vitro* e *in situ* de citocinas de perfil Th1 e Th2, respectivamente, nesses dois pólos, uma vez que esse paradigma reflete o grau de imunidade celular desses pacientes frente ao *M. leprae*.⁽⁴³⁻⁴⁶⁾

No grupo dimorfo tem se postulado que o comportamento das citocinas estaria associado com a proximidade desses pacientes nos pólos tuberculóide ou virchoviano.⁽¹⁰⁸⁾ Deste modo, os estudos que abordam este aspecto têm agrupado os pacientes HDT com os HT e os pacientes HDV ou com os pacientes HDD ou com os HV.^(60,76,77,87,108) Sendo assim, são escassos os estudos que avaliam os níveis de citocinas em sobrenadante de PBMC de pacientes HDT e HDV, isoladamente. Neste sentido, encontramos o trabalho realizado por Misra et al.⁽⁷⁸⁾ que observaram perfis Th1 e Th0 nos pacientes HDT e perfis Th0 e Th2 nos pacientes HDV, entretanto somente 7 pacientes foram avaliados.

Em nosso estudo o fato de termos encontrado maiores níveis de IFN- γ nos pacientes HDT estaria relacionado a um aumento da RIC com produção dos metabólitos do oxigênio e do nitrogênio e, conseqüente, morte dos bacilos. Apóia esta premissa os achados do índice baciloscópico dos pacientes HDT, que

oscilou de 0 a 1+. Ao contrário, nos pacientes HDV o índice baciloscópico variou de 2 a 6+ (mediana de 4+), possivelmente por apresentarem menor RIC ao *M. leprae*.

Como já mencionado, neste estudo não verificamos diferenças significativas na produção de TNF- α , IL-10 e TGF- β 1 em sobrenadante de cultura entre pacientes HDT e HDV.

A citocina TNF- α tem sido implicada em diversas patologias inflamatórias, tumorais e infecciosas. Os macrófagos ativados são as principais células produtoras dessa citocina; no entanto, a mesma é produzida por diversos tipos celulares, como linfócitos T e B, mastócitos, células NK, neutrófilos, células endoteliais, fibroblastos, células musculares e osteoclastos.⁽¹⁰⁹⁾ De modo geral, durante o processo inflamatório, o TNF- α atua nas células endoteliais vasculares promovendo aumento da expressão de moléculas de adesão leucocitária, migração transendotelial e extravasamento vascular; promove também aumento da capacidade microbicida dos fagócitos, sendo essencial para a formação do granuloma.^(110, 111)

No grupo dimorfo não encontramos estudos que avaliam a produção de TNF- α por PBMC comparando os níveis dessa citocina entre HDT e HDV. No estudo realizado por Barnes et al.⁽⁵⁸⁾, os autores verificaram aumento da produção dessa citocina em sobrenadante de PBMC estimulados com antígenos do *M. leprae* nos pacientes HDT quando comparados com pacientes HV; já a produção espontânea de TNF- α não diferiu entre esses dois grupos.

Pacientes do grupo dimorfo frequentemente apresentam manifestações de episódios reacionais de reação reversa (RR) e eritema nodoso hansênico

(ENH).^(111, 112) A RR é uma reação de hipersensibilidade tardia (do tipo IV de Gel & Coombs) causada por uma mudança abrupta na RIC do hospedeiro frente ao *M. leprae*. O ENH é caracterizado pelo aparecimento de focos de inflamação aguda, instalados ao longo dos granulomas de pacientes multibacilares, e pela deposição de imunocomplexos em vários locais do organismo (hipersensibilidade do tipo III de Gel & Coombs).⁽³⁸⁾ Nesse contexto, observa-se que pacientes HT e HDT apresentam com maior frequência manifestações de RR e os pacientes HV e HDV, episódios de ENH.^(111,113,114) Diversos autores têm demonstrado a participação do TNF- α nesses episódios, principalmente no ENH que apresenta elevados níveis dessa citocina.^(51,58,115,116)

Embora os mecanismos envolvidos na participação do TNF- α nesses processos não estejam totalmente esclarecidos e considerando o fato dos indivíduos HDV serem mais propensos a exibirem ENH, assim como os pacientes HDT apresentarem maior resistência ao bacilo, é possível que, nas condições ensaiadas, a produção similar de TNF- α no grupo dimorfo indique um comportamento pleiotrópico dessa citocina. Além disso, considerando que o TNF- α atua sinergicamente com o IFN- γ aumentando a capacidade microbicida dos fagócitos e favorecendo a manutenção do granuloma, é possível que nos pacientes HDT sua presença favoreça a contenção do processo infeccioso com conseqüente diminuição da carga bacilar; entretanto, nos pacientes HDV a presença de níveis diminuídos de IFN- γ poderiam favorecer a proliferação do bacilo.^(108,109)

No presente estudo verificamos que pacientes HDT e HDV produziram níveis semelhantes de IL-10. A IL-10 é uma citocina inibidora da atividade de

células Th1, células NK e macrófagos. Ela inibe a síntese de INF- γ , IL-2, IL-12 e TNF- α , além de inibir a proliferação dos linfócitos Th1.⁽¹¹⁷⁾ Deste modo, a IL-10 é considerada uma citocina capaz de deprimir a RIC e consequentemente, impedir o *clearance* do patógeno. Diferentes tipos celulares podem produzir essa citocina, tais como monócitos/macrófagos, mastócitos, eosinófilos, células dendríticas, linfócitos B, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos Th2.⁽¹¹⁸⁻¹²⁰⁾

Na hanseníase tem sido observada maior expressão de mRNA para IL-10 em lesões de pacientes HV, assim como maior expressão de IL-4 e IL-5, sendo esses achados correlacionados a uma RIC ineficiente ou mesmo ausente ao *M. leprae*.^(54,121) Apóiam essa premissa, ensaios *in vitro* utilizando anticorpos monoclonais anti-IL-10 que demonstraram proliferação de células T *M. leprae*-específica e aumento na produção de IFN- γ , TNF- α e GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos).⁽⁵³⁾ Por outro lado, vários estudos têm demonstrado resultados opostos aos descritos acima. Trao et al.⁽⁷⁶⁾ verificaram aumento na produção de IL-10 em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes HT/HDT e não em HV. Aliado a isso, pesquisadores demonstraram que clones de células T obtidas das lesões de pacientes HV produziram baixos níveis dessa citocina.^(53,122) Recentemente, Iyer et al.⁽¹⁰⁸⁾ verificaram produção similar de IL-10 em sobrenadante de cultura de células extraídas da lesão de pacientes HDT e HDV/HV. Esses achados corroboram os resultados encontrados em nosso estudo de uma produção semelhante de IL-10 entre os pacientes avaliados.

Com relação ao TGF- β 1, também não verificamos diferença significativa entre pacientes HDT e HDV. TGF- β são moléculas conservadas com papéis

pleiotrópicos que atuam em tipos celulares variados e participam de diversos processos biológicos, incluindo a resposta imune; podem ser sintetizadas principalmente por monócitos/macrófagos e células Th3.⁽¹²³⁻¹²⁵⁾ Apresentam 3 isoformas em mamíferos (TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3), sendo o TGF- β 1 a principal forma expressa no sistema imune. Na forma ativa, o TGF- β inicia sua atividade biológica através da ligação com os receptores TGF- β tipo I (TGF- β RI) e tipo II (TGF- β RII); em seguida, alvos citoplasmáticos são fosforilados e ativam vias de sinalização.⁽¹²⁶⁾ O TGF- β 1 tem ação supressora sobre macrófagos impedindo os efeitos do IFN- γ na ativação da atividade antimicrobiana mediada pelo NO e inibindo a produção de TNF- α , dessa forma pode contribuir para a perpetuação do processo infeccioso.⁽¹²⁷⁾

De modo geral, na hanseníase tem sido demonstrado a presença de TGF- β 1 em maiores níveis nos indivíduos HV.^(41,60,71,128) Em sobrenadante de cultura de células, Goulart et al.⁽¹²⁹⁾, estudando células aderidas de PBMC, verificaram diferenças na produção dessa citocina nas formas polares da doença. Entre pacientes HDT e HDV, os pesquisadores não encontraram diferenças em culturas estimuladas ou não com PGL-I. Embora no presente estudo tenhamos utilizado população mista de células sanguíneas (linfócitos e monócitos), nossos resultados são concordes com a produção semelhante de TGF- β 1 no grupo dimorfo conforme observado por esses pesquisadores.

É possível que a presença de TGF- β 1 nos pacientes do grupo dimorfo possa contribuir para a instabilidade imunológica observada nesses pacientes. Segundo Goulart et al.⁽⁴¹⁾, nos pacientes HV a indução de TGF- β 1 seria essencial para estabelecer o curso da infecção hanseníca na ausência de IFN- γ ,

determinando a proliferação bacilar dentro do macrófago e, esta proliferação descontrolada, promoveria o desenvolvimento do padrão de resposta Th2. Nos pacientes HDV fato semelhante poderia ocorrer, uma vez que esses pacientes exibem baixos níveis de IFN- γ e elevado índice baciloscópico (mediana 4+).

Quanto aos resultados obtidos nos pacientes dimorfos e grupo controle, a análise estatística revelou que pacientes HDT produziram níveis menores de TGF- β 1 na presença de PHA e na ausência desse estímulo inespecífico (produção espontânea); os pacientes HDV também tiveram níveis menores dessa citocina na presença de PHA e Ag8, em comparação com o grupo controle. Os estudos empregando monócitos do sangue periférico têm demonstrado resultados opostos aos obtidos por nós. Neste sentido, Goulart et al.⁽¹²⁹⁾ encontraram níveis mais elevados de TGF- β 1 nos pacientes HDT/HDD e HDV/HV em comparação com indivíduos saudáveis. Do mesmo modo, Toossi et al.⁽¹³⁰⁾ também encontraram níveis mais elevados dessa citocina em pacientes com tuberculose ativa. É possível que pelo fato de termos trabalhado com culturas de PMBC (monócitos e linfócitos) tenhamos obtido esse resultado divergente.

Quanto aos resultados da IL-10 verificamos, também, menor produção dessa citocina em culturas não estimuladas de pacientes HDV quando comparados com o grupo controle. Estudos comparativos entre os níveis dessa citocina em pacientes dimorfos e indivíduos sadios não foram encontrados; essa comparação foi realizada apenas entre pacientes com as formas polares da doença (HT e HV) e indivíduos saudáveis e revelaram produção semelhante de IL-10 nos grupos avaliados.⁽⁸⁸⁾

Nesse contexto podemos inferir que os menores níveis de TGF- β 1 e IL-10 observados nos pacientes dimorfos, associado a uma produção constante dessas citocinas, poderiam ser necessários para manter a cronicidade da doença, à semelhança do que ocorre na leishmaniose em que a produção baixa e constante de IL-10 parece ser crucial para a cronificação desta infecção parasitária.⁽¹³¹⁾

A análise estatística dos resultados não revelou diferença significativa entre pacientes dimorfos e grupo controle quanto aos níveis de TNF- α e INF- γ .

Na literatura consultada, os estudos que abordam a produção de TNF- α entre pacientes dimorfos e indivíduos sadios são inexistentes. O que se tem observado é que entre pacientes HT e grupo controle a produção *in vitro* dessa citocina é maior em pacientes HT.⁽⁸⁸⁾ Também tem sido observada elevada produção de TNF- α *in vitro* em pacientes HT quando comparados com pacientes HV.^(54,57,88,132) Em outras infecções intracelulares, a produção *in vitro* de TNF- α entre doentes e controles são discordantes, ora apresentando diferenças entre eles, ora não.^(101,133-135) Assim, nossos resultados sugerem que macrófagos de pacientes dimorfos não apresentam deficiências em produzir TNF- α .

A respeito da produção de INF- γ , alguns estudos têm demonstrado níveis aumentados dessa citocina em soro de pacientes HDT, em comparação com indivíduos sadios.^(136,137) Por outro lado, os resultados realizados por Machado et al.⁽⁸⁸⁾ demonstraram que pacientes hansenianos apresentam diminuição da resposta linfoproliferativa frente a antígenos do *M. leprae*, e não frente à PHA, quando comparados aos indivíduos sadios; os autores verificaram, ainda, maior

resposta linfoproliferativa em pacientes HDT em comparação com pacientes HV. Do mesmo modo, Weir et al.⁽⁷⁷⁾ demonstraram que a produção de INF- γ em sobrenadante de cultura de PBMC de pacientes com hanseníase era menor que indivíduos do grupo controle e que, em pacientes HT/HDT os níveis eram mais elevados em comparação aos pacientes HV/HDV. Em outras infecções granulomatosas, os resultados em sobrenadante de cultura de PBMC também são variados. Na tuberculose, pesquisadores têm demonstrado que os pacientes exibem níveis maiores de INF- γ em comparação com o grupo controle; por outro lado, na paracoccidioidomicose os níveis dessa citocina parecem ser menores nos pacientes.⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾ Na doença de Jorge Lobo, Vilani-Moreno et al.⁽¹⁰¹⁾ não verificaram diferenças significantes na produção de INF- γ entre pacientes e indivíduos do grupo controle.

Deste modo, o conjunto dos resultados obtidos em sobrenadante de cultura de PBMC sugere que os pacientes dimorfos apresentam perfis misto de citocinas; entretanto, nos pacientes HDT a presença de INF- γ aponta para um perfil Th1 mais evidente.

5.2. Detecção de citocinas e da enzima iNOS nas lesões cutâneas

Além de quantificarmos as citocinas TNF- α , IL-10, TGF- β 1 e IFN- γ em sobrenadante de cultura, também pesquisamos a presença desses mediadores *in situ*, pois, até o momento, não encontramos nenhum estudo onde esses dois parâmetros foram avaliados e, posteriormente, correlacionados em pacientes dimorfos.

Nossos resultados revelaram que a expressão da enzima iNOS *in situ* foi maior nos pacientes HDT em comparação aos HDV. A enzima iNOS pode ser empregada como marcador de RIC e indicador da produção de INF- γ ; deste modo, empregamos esse marcador em substituição ao IFN- γ em decorrência da facilidade de sua detecção em cortes parafinados.⁽¹⁴¹⁾ Na literatura consultada, encontramos somente três trabalhos que avaliaram a expressão *in situ* dessa enzima nos pacientes dimorfos. Em um deles, os pesquisadores avaliaram apenas pacientes HDT e não encontraram células imunomarcadas pela enzima iNOS nas lesões cutâneas.⁽⁷¹⁾ Ao contrário, nos outros estudos, foi observada a presença do iNOS nas lesões de pacientes HDT. Neste sentido, Schön et al.⁽⁶³⁾ encontram aumento de iNOS em lesões HDT em comparação com HDV, sendo que somente nos HDT mais de 20% das células estavam marcadas. No trabalho realizado por Belone⁽⁷⁵⁾ foi demonstrado que 11 a 20% das células presentes no granuloma de pacientes HDT coraram-se pelo iNOS. Esses achados estão em concordância com aqueles obtidos no presente estudo.

A presença da enzima iNOS *in situ* associada com o índice baciloscópico, que nos pacientes HDT variou de 0 a 1+ reforça a participação de uma RIC eficiente contra o bacilo. Já nos pacientes HDV, embora a enzima iNOS também estivesse presente, porém em menor quantidade, o índice baciloscópico foi de 4+ e as citocinas TGF- β 1 e IL-10 foram detectadas em um grande número de células. Essa situação não favoreceu o desenvolvimento de uma RIC eficiente, sendo assim, os pacientes permaneceram com elevada carga bacilar.

O número de células que estavam expressando TGF- β 1 nas lesões foi maior nos pacientes HDV quando comparados com os HDT. A presença dessa citocina tem sido investigada por diversos autores nas formas polares da hanseníase bem como no grupo dimorfo.^(60,71,73) No estudo realizado por Goulart et al.⁽⁶⁰⁾, a pesquisa de TGF- β 1 nas lesões de pacientes dimorfos mostrou intensa marcação no subgrupo de menor resistência (HDV), enquanto no subgrupo de maior resistência (HDT) não houve imunorreação detectável nas células dos granulomas. Resultados diferentes foram encontrados por Khanolkar-Young et al.⁽⁷¹⁾, que verificaram positividade para essa citocina também em pacientes HDT. Recentemente, um estudo realizado por Anderson et al.⁽⁷³⁾ revelou positividade à essa citocina em 10-30% das células nos granulomas de 4 pacientes que foram agrupados como HDT/HDV. Deste modo, no grupo dimorfo não parece haver uma concordância quanto à presença do TGF- β 1 nas lesões cutâneas.

Quanto à citocina IL-10, não houve diferença significativa entre pacientes HDT e HDV. Na literatura consultada, encontramos dois estudos que avaliaram a presença dessa citocina nas lesões de pacientes HDT através da expressão de mRNA e imunoistoquímica.^(75,142) Nesses estudos os pesquisadores verificaram produção consistente de IL-10 tanto nos pacientes HDT como nos HT, entretanto o grupo HDV não foi avaliado.

Conforme mencionado, acreditamos que a presença de IL-10, juntamente com o TGF- β 1, nas lesões de pacientes HDV, favoreceu a manutenção dos bacilos nos granulomas, uma vez que tanto a IL-10 quanto o TGF- β 1 atuariam deprimindo a RIC ao *M. leprae*. Nos pacientes HDT, os níveis

menores de TGF- β 1 e a expressão elevada da enzima iNOS, associados a presença de células imunomarcadas para IL-10 na periferia do granuloma e no interstício do tecido, sugerem um papel imunorregulador para IL-10. Cabe ressaltar, entretanto, que não foi possível identificar essas células, com segurança, tomando-se como parâmetro apenas as suas características morfológicas; julgamos que para uma identificação mais precisa seria necessário o emprego simultâneo de dois marcadores, isto é, o anticorpo anti-IL-10 e o anticorpo anti-CD3, específico para linfócitos T, assim, poderíamos demonstrar se esta citocina estaria sendo produzida por linfócitos T e/ou histiócitos.

Atualmente, dois tipos de linfócitos T com função regulatória foram identificados, os linfócitos Th3 e os linfócitos Treg. As células Th3 são linfócitos T auxiliares produtores de TGF- β 1 e IL-10 que estão associados ao processo de reparo tecidual, fibrose e regulação da resposta imune Th1 e Th2.⁽¹⁴³⁾ As células Treg são linfócitos T auxiliares identificados por expressarem os marcadores CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e por produzirem TGF- β 1 e IL-10.⁽¹⁴³⁾ Embora o exato mecanismo de ação dessas citocinas não esteja totalmente elucidado, tem sido descrito que a produção de TGF- β 1 atuaria diretamente sobre linfócitos T nos mecanismos de tolerância imunológica e que a IL-10 regularia a interface da imunidade inata e adaptativa, de modo a limitar a magnitude da resposta frente a antígenos microbianos.⁽¹⁴⁴⁾

O papel imunorregulador da IL-10 na hanseníase também foi sugerido por outros pesquisadores. Stefani et al.⁽¹⁴²⁾, estudando lesões de pacientes paucibacilares com lesão única, encontraram correlação positiva entre a

expressão de mRNA para IL-10 e INF- γ , IL-10 e IL-12 e entre IL-10 e TNF- α . Belone⁽⁷⁵⁾ verificou imunomarcação consistente de IL-10 nas lesões de pacientes HT e HDT reacionais e não reacionais, entretanto somente nas manifestações reacionais houve aumento significativo de células IL-10⁺, sugerindo ativação de células Th3 como uma tentativa de desarme de reação muito agressiva para os tecidos. Assim, esses resultados em conjunto com nossos achados reforçam o papel da IL-10 como uma citocina imunorreguladora.

Em relação ao TNF- α , tínhamos como finalidade avaliar a imunomarcação dessa citocina nas lesões dos pacientes aqui estudados. No entanto, após exaustivas tentativas, não obtivemos sucesso em obter resultados satisfatórios devido a marcações inespecíficas do anticorpo anti-TNF- α utilizado.

A produção dessa citocina na lesão de pacientes dimorfos é contraditória e têm revelado diferenças consistentes entre os trabalhos. Khanolkar-Young et al.⁽⁷⁴⁾ verificaram baixa porcentagem de células positivas para o TNF- α nos pacientes HDT e HDV. Arnoldi et al.⁽⁵⁷⁾ e Flad et al.⁽¹⁴⁵⁾ não encontraram células positivas nos pacientes HDV; entretanto quando o mesmo estudo foi realizado em pacientes tratados, tanto pacientes HDV quanto HDT apresentavam poucas células marcadas na porção central do granuloma. Por outro lado, Sugita et al.⁽¹⁴⁶⁾, estudando um caso de HDV virgem de tratamento, verificaram depósitos de TNF- α nas células mononucleares do infiltrado celular. Após o tratamento de um ano, uma intensa diminuição na imunomarcação das células

nos granulomas foi observada. Assim, as diferenças encontradas na literatura levam a necessidade de que outros estudos *in situ* sejam realizados.

A correlação dos achados das lesões cutâneas revelou que nos pacientes HDV existe uma correlação negativa entre a expressão tecidual de TGF- β 1 e IL-10. Esse quadro indica que nas lesões HDV pelo menos uma dessas citocinas está presente em níveis elevados, sugerindo que além de desempenharem um papel imunossupressor, elas poderiam também estar atuando como citocinas regulatórias. Nas doenças infecciosas granulomatosas, como leishmaniose e paracoccidioidomicose, foi demonstrado aumento na expressão e função das células Treg das lesões e foi sugerido que elas poderiam contribuir para a persistência do parasita e indução da cronicidade do quadro infeccioso.⁽¹⁴⁷⁻¹⁴⁹⁾ Na hanseníase, a participação dessas células na lesão não foi descrita até o momento; entretanto é possível que fato semelhante esteja acontecendo no grupo dimorfo, particularmente nos HDV, uma vez que numerosos bacilos foram encontrados nas lesões desses pacientes.

Independentemente da forma clínica, observamos uma correlação positiva entre TGF- β 1 e IB e negativa entre a expressão tecidual de TGF- β 1 e iNOS. Esse resultado está em concordância com o papel imunossupressor do TGF- β 1, uma vez que essa citocina inibe a expressão do INF- γ e a atividade lítica dos macrófagos por suprimir a produção dos ROI e RNI. Deste modo, a presença de bacilos nas lesões reflete o fracasso de uma RIC efetiva contra o *M. leprae*, quadro característico dos pacientes multibacilares, particularmente os HDV que foram objeto deste estudo.

Em resumo, a correlação positiva verificada entre TGF- β 1 e IB, a

correlação negativa entre TGF- β 1 e iNOS, a presença elevada de iNOS nas lesões HDT, a presença elevada de TGF- β 1 nas lesões HDV e a presença de IL-10 em níveis maiores, embora não significativa nos pacientes HDV, sugerem que pacientes dimorfos exibem perfis misto de citocinas, sobressaindo um perfil Th1 nos pacientes HDT e Th2 nos pacientes HDV, com possível participação de linfócitos T regulatórios. Cabe ressaltar, entretanto, que os resultados obtidos nesse estudo refletem o que está acontecendo em um determinado momento do processo evolutivo da doença, uma vez que esses pacientes apresentam instabilidade imunológica e que, se não tratados, tendem a evoluir para o pólo de menor resistência.⁽¹⁵⁰⁾

5.3. Correlação entre os achados das citocinas no sobrenadante de cultura e nas lesões cutâneas

Muitos pesquisadores têm utilizado PBMC, cultivadas *in vitro*, para avaliar as alterações que ocorrem nas lesões cutâneas decorrentes da interação entre o agente infeccioso e o hospedeiro.^(95,140,151-153) De modo geral, nesses trabalhos são feitos estudos comparativos entre os achados do sangue periférico e àqueles encontrados *in situ*. No presente estudo, entretanto, procuramos analisar os resultados empregando um método estatístico, o coeficiente de correlação. Nossos resultados revelaram correlação positiva entre a expressão de iNOS tecidual e a produção de IFN- γ por PBMC estimuladas com antígenos do *M. leprae*.

Na literatura consultada, são poucos os estudos que fazem esse tipo de

correlação. Na úlcera de Buruli, pesquisadores verificaram correlação positiva entre a expressão de INF- γ na lesão e a produção dessa citocina em sangue total estimulado com antígeno sonicado de *M. ulcerans*.⁽¹⁵³⁾ Na hanseníase, não encontramos nenhum estudo empregando esse tipo de análise.

Quanto aos resultados da IL-10, não verificamos correlação entre o sobrenadante e a lesão, entretanto, a produção de IL-10 *in situ* foi semelhante àquela encontrada no sobrenadante de PBMC, uma vez que a análise estatística não mostrou diferença significativa entre pacientes HDT e HDV. Deste modo, podemos inferir que a cultura de PBMC refletiu os achados das lesões cutâneas.

Em relação ao TGF- β 1, não foi encontrado correlação entre os achados do sobrenadante de cultura com os observados *in situ*.

Considerando esses resultados podemos sugerir que a cultura de PBMC é um bom parâmetro para avaliar as alterações imunológicas que ocorrem nas lesões cutâneas, entretanto ela não reflete totalmente o que está acontecendo *in situ*. Cabe salientar, contudo, que a produção *in vitro* de citocinas é útil para se determinar o perfil de resposta imune, principalmente quando não é possível realizar essa análise *in situ*.

Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo sugerem que pacientes dimorfos exibem perfis misto de citocinas, sobressaindo um perfil Th1 nos pacientes HDT e Th2 nos pacientes HDV, com possível participação de linfócitos Th3 e/ou Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺).

Conclusões

A análise dos resultados obtidos neste estudo permitiu elaborar as seguintes conclusões:

1. Pacientes dimorfos exibem perfis mistos de citocinas, sobressaindo um perfil Th1 nos pacientes HDT e Th2 nos pacientes HDV com possível participação de linfócitos T regulatórios; reforçando o conceito da instabilidade imunológica vista nesses pacientes.
2. O sobrenadante de cultura de PBMC é um bom parâmetro para avaliar as alterações imunológicas que ocorrem nas lesões cutâneas e pode ser empregado na determinação do perfil da resposta imune, principalmente quando não se dispõe da análise *in situ*.

Referências Bibliográficas

1. Hansen GHA. Üdersogelsen angaend spedalsskhendens arsager. Norsk Laegevil 1873; 4: 1-88.
2. Opromolla DVA. História. In: Opromolla DVA, editor. Noções de Hansenologia. 2 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.1-5.
3. Brasil. Decreto Federal nº 5.156, de 8 de março de 1904. Regulamento Sanitário Federal. Brasília (DF); 1904.
4. Brasil. Decreto Federal nº 968, de 7 de maio de 1962. Internação de doentes de lepra em hospitais especializados - Leprocômios. Brasília (DF); 1962.
5. Rotberg A. O pejorativo "lepra" e a grande vítima de grave erro médico-social-histórico: a indefesa América Latina. Rev Hist 1975; 101: 293-305.
6. São Paulo (Estado). Deliberação SS/CTA nº 7: Terminologia referente à hanseníase. 10/12/70. Publicada no Diário Oficial do Estado de São Paulo de 11 de dezembro de 1970.
7. Brasil. Decreto Federal nº 76.078, de 04 de agosto de 1975. Altera a denominação de órgãos do Ministério da Saúde e dá outras providências. Brasília (DF); 1975.
8. Brasil. Lei Federal nº 9.010, de 29 de março de 1995. Dispõe sobre a terminologia oficial relativa à hanseníase e dá outras providências. Brasília (DF); 1995.
9. Brasil. Lei Federal nº 11.520, de 18 de setembro de 2007. Dispõe sobre a concessão de pensão especial às pessoas atingidas pela hanseníase

- que foram submetidas a isolamento e internação compulsórios. Brasília (DF); 2007.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica. Guia para Controle da Hanseníase. Brasília: Ministério da Saúde; 2002.
 11. Pallen MJ, McDermott RD. How might *Mycobacterium leprae* enter the body? *Lepr Rev* 1986; 57: 289-97.
 12. World Health Organization. Expert Committee on leprosy: fourth reports. *Tech Rep Ser/ World Health Organ* 1977; 607: 1-48
 13. Moraes MO, Cardoso CC, Vanderborght PR, Pacheco AG. Genetics of host response in leprosy. *Lepr Rev* 2006; 77: 189-202.
 14. Davey TF, Rees RJW. The nasal discharge in leprosy: clinical and bacteriological aspects. *Lepr Rev* 1974; 45: 121-34.
 15. Vilani-Moreno FR, Arruda MSP, Nogueira MES, Baptista IMFD. Hanseníase experimental murina: inoculação do *Mycobacterium leprae* via intranasal. *Hansen Int* 1999; 24: 115-20.
 16. Job CK, Jayakumar J, Kearney M, Gillis TP. Transmission of leprosy: a study of skin and nasal secretions of household contacts of leprosy patients using PCR. *Am J Trop Med Hyg* 2008; 78: 518-21.
 17. World Health Organization. Global leprosy situation, 2007. *Wkly Epidemiol Rec* 2007; 82: 225-32.
 18. Brasil. Ministério da Saúde [homepage na Internet]. Secretaria Executiva. Datasus [citado 2008 agosto 10]. Indicadores de morbidade e

- fatores de risco. Taxa de prevalência de hanseníase. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?idb2007/d09.def>> Acesso em 10 ago 2008.
19. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Programa Nacional de Eliminação da Hanseníase. Plano Nacional de Eliminação da Hanseníase em nível municipal 2006-2010. 2002. Brasília.
20. World Health Organization. Global leprosy situation, 2004. Wkly Epidemiol Rec 2005; 80: 118-24.
21. World Health Organization. Global leprosy situation, 2005. Wkly Epidemiol Rec 2005; 80: 289-96.
22. World Health Organization. Global leprosy situation, 2006. Wkly Epidemiol Rec 2006; 81: 309-16.
23. Meima A, Smith WC, van Oortmarsen GJ, Richardus JH, Habbema JD. The future incidence of Leprosy: a scenario analysis. Bull World Health Organ 2004; 82: 373-80.
24. Rees RJW, Young DB. The microbiology of leprosy. In: Hastings RC, editor. Leprosy. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 49-83.
25. Draper P, Misell DL. Determination of the mass of *Mycobacterium leprae* by electron microscopy. J Gen Microbiol 1977; 101: 207-9.
26. Daffe M, McNeil M, Brennan PJ. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. Carbohydr Res 1993; 249:383-98.

-
27. Draper P, Kandler O, Darbre A. Peptidoglycan and arabinogalactan of *Mycobacterium leprae*. J Gen Microbiol 1987; 133: 1187-94.
 28. Vissa VD, Brennan PJ. The genome of *Mycobacterium leprae*: a minimal mycobacterial gene set. Genome Biol 2001; 2: 1023.
 29. Barrow WW, Brennan PJ. Isolation in high frequency of rough variants of *Mycobacterium intracellulare* lacking C-mycoside glycopeptidolipid antigens. J Bacteriol 1982; 150: 381-4.
 30. Hunter SW, Fujiwara T, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the major specific glycolipid antigen of *Mycobacterium leprae*. J Biol Chem 1982; 25: 15072-8.
 31. Hunter SW, Gaylord H, Brennan PJ. Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. J Biol Chem 1986; 15: 12345-51.
 32. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 338-81.
 33. Truman RW, Krahenbuhl JL. Viable *M. leprae* as a research reagent. Int J Lepr 2001; 69: 1-12.
 34. Madeira S, Rosa PS. Hanseníase Experimental. In: Opromolla DVA, editor. Noções de Hansenologia. 2 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.19-26.
 35. Krahenbuhl JL, Adams LB. Exploitation of gene knockout mice models to study the pathogenesis of leprosy. Lepr Rev 2000; 71: S170-5.

-
36. Hayashi Y. On a pure culture of leprosy bacilli and skin reaction by means of the pure culture suspensions. *Int J Lepr* 1933; 1:31-8.
 37. Mitsuda K. On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. *Int J Lepr* 1953; 21:347-58.
 38. Nogueira MES, Vilani-Moreno FR, Silva EA, Arruda MSP. Imunologia. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. 2 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.27-42.
 39. Chin-A-Lien RAM, Faber WR, Van Rens MM, Leiker DL, Naafs B, Klatser PR. Follow-up of multibacillary leprosy patients using a phenolic glycolipid-I based ELISA. Do increasing ELISA-values after discontinuation of treatment indicate relapse? *Lepr Rev* 1992; 63: 21-7.
 40. Sekar B. Recent advances in immunodiagnosis of leprosy. *Indian J Lepr* 2007; 79: 85-106.
 41. Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; 35: 365-75.
 42. Opromolla DVA. Manifestações Clínicas e Reações. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. 2 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.51-8.
 43. Turk JL. Cell mediated immunological process in leprosy. *Lepr Rev* 1970; 41: 207-22.
 44. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five groups system. *Int J Lepr* 1966; 34: 255-73.

-
45. Kaufmann SHE. Cell-mediated immunity. In: Hastings RC, editor. Leprosy. 2 ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p. 157-68.
 46. Naafs B, Silva E, Vilani-Moreno F, Marcos EC, Nogueira ME, Opromolla DVA. Factors influencing the development of leprosy: an overview. *Int J Lepr* 2001; 69: 26-33.
 47. Congresso Internacional de Leprologia, 6, Madrid, 1953. *Memória Association International de la Lepra*, 1953. 1344p.
 48. Fleury RN. Patologia e Manifestações Viscerais. In: Opromolla DVA, editor. *Noções de Hansenologia*. 2 ed. Bauru: Centro de Estudos Dr Reynaldo Quagliato. Instituto Lauro de Souza Lima; 2000. p.63-71.
 49. World Health Organization. Chemotherapy of leprosy for control programmes. WHO Technical Report Series. Genova, 1982; 675: 37p.
 50. Kaufmann SHE. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunol Today* 1995; 16: 338-42.
 51. Modlin RL, Mehra V, Wong L, Fujimiya Y, Chang W-C, Horwitz DA, et al. Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. *J Immunol* 1986; 137: 2831-4.
 52. Modlin RL, Melancon-Kaplan J, Young SMM, Pirmez C, Kino H, Convit J, et al. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 1213-7.
 53. Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, et al. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection: *in*

- vitro* modulation of T cell responses in leprosy. J Immunol 1993; 150: 5501-10.
54. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR, et al. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. Science 1991; 254: 277-9.
55. Mutis T, Kraakman EM, Cornelisse YE, Haanen JBAG, Spits H, De Vries RRP, et al. Analysis of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive T cells. Failure to explain *Mycobacterium leprae*-specific non responsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. J Immunol 1993; 150: 4641-51.
56. Rojas-Espinosa O. Active humoral immunity in the absence of cell-mediated immunity in murine leprosy: lastly an explanation. Int J Lepr 1994; 62: 143-7.
57. Arnoldi J, Gerdes J, Flad HD. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. Am J Pathol 1990; 137: 749-53.
58. Barnes PF, Chatterjee D, Brennan PJ, Tea TH, Modlin RL. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. Infect Immun 1992; 60: 1441-6.
59. Sieling PA, Wang XH, Gately MK, Oliveros JL, McHugh T, Barnes PF, et al. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine response in human infectious disease. J Immunol 1994; 153: 3639-47.
60. Goulart IBM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor- β 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. Am J Pathol 1996; 148: 911-7

-
61. Vespa GNR, Silva JS. Óxido nítrico (NO): produção e significado fisiológico durante as infecções. *Rev Pat Trop* 1994; 23: 1-23.
 62. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. The L-arginine - Nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 43: 109-42.
 63. Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Brit J Dermatol* 2001; 145: 809-15.
 64. Ross R, Gillitzer C, Kleinz R, Schwing J, Kleinert H, Forstermann U, et al. Involvement of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunol* 1998; 10: 61-9.
 65. Oliveira SH, Fonseca SG, Romão PR, Figueiredo F, Ferreira SH, Cunha FQ. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. *Parasite Immunol* 1998; 20: 405-12.
 66. Batista AC. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis* 2002; 8: 254-60.
 67. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, Mcsorley SJ, Garside P, et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 980-4.
 68. Fox SW, Chow JW. Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* 1998; 23: 1-6.

-
69. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-206.
70. Adams LB, Franzblau SG, Vavrin Z, Hibbs JB, Krahenbuhl JL. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol* 1991; 147: 1642-6.
71. Khanolkar-Young S, Snowden D, Lockwood DNJ. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF- β) in leprosy lesions. *Clin Exp. Immunol* 1998; 113: 438-42.
72. McClean K, G/Yesus E, Cenini P, Demissie A, Amare G. Phenotype and cytokine expression of intralesional cells in borderline leprosy. *Int J Lepr* 1994; 62: 380-8.
73. Andersson AK, Chaduvula M, Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Jain S, Suneetha L, et al. Effects of prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infect Immun* 2005; 73: 3725-33.
74. Khanolkar-Young S, Rayment N, Brickell PM, Katz DR, Vinayakumar S, Colston MJ, et al. Tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) synthesis is associated with the skin and peripheral nerve pathology of leprosy reversal reactions. *Clin Exp Immunol* 1995; 99: 196-202.
75. Belone AFF. Hanseníase na faixa tuberculóide: estudo comparativo entre manifestações tórpidas e reacionais através de avaliações de antígenos micobacterianos e de parâmetros representativos de hipersensibilidade mediada por células em biópsias cutâneas. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2004.

-
76. Trao VT, Huong PL, Thuan AT, Anh DD, Trach DD, Rook GA, et al. Changes in cellular response to mycobacterial antigens and cytokine production patterns in leprosy patients during multiple drug therapy. *Immunology* 1998; 94: 197-206.
77. Weir RE, Brennan PJ, Butlin CR, Dockrell HM. Use of a whole blood assay to evaluate in vitro T cell responses to new leprosy skin test antigens in leprosy patients and healthy subjects. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 263-9.
78. Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V, et al. Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology* 1995; 86: 97-103.
79. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77-89.
80. Faraco J. Bacilos de Hansen e cortes de parafina: método complementar para pesquisa de bacilos de Hansen em cortes de material incluído em parafina. *Rev. bras. Leprol* 1938; 6: 177-80.
81. Fite GL. Staining of acid-fast bacilli in parafin sections. *Am J Pathol* 1938; 14: 491-507.
82. Vilani-Moreno FR, Belone AF, Soares CT, Opromolla DV. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. *Rev Iberoam Micol* 2005; 22: 44-9.
83. Ridley DS. A logarithmic index of bacilli in biopsies. 2. Evaluation. *Int J Lepr* 1967; 35: 187.

-
84. Norman GR, Streiner DL. Biostatistics - The Base Essentials. St. Louis: Mosby Year Book; 1994.
85. Blackwell JM. Parasite genome analysis. Progress in the *Leishmania* genome project. Trans R Soc Trop Med Hyg 1997; 91: 107-10.
86. Matos DS, Azeredo-Coutinho RB, Schubach A, Conceição-Silva F, Baptista C, Moreira JS, et al. Differential interferon- gamma production characterizes the cytokine responses to *Leishmania* and *Mycobacterium leprae* antigens in concomitant mucocutaneous leishmaniasis and lepromatous leprosy. Clin Infect Dis 2005; 40: e5-12.
87. Dockrell HM, Young SK, Britton K, Brennan PJ, Rivoire B, Waters MF, et al. Induction of Th1 cytokine responses by mycobacterial antigens in leprosy. Infect Immun 1996; 64: 4385-9.
88. Machado P, Abrams J, Santos S, Brennan P, Barral A, Barral-Netto M. Production of host-protective (IFN-gamma), host-impairing (IL-10, IL-13) and inflammatory (TNF-alpha) cytokines by PBMC from leprosy patients stimulated with mycobacterial antigens. Eur J Dermatol 1998; 8: 98-103.
89. García VE, Quiroga MF, Ochoa MT, Ochoa L, Pasquinelli V, Fainboim L, et al. Signaling lymphocytic activation molecule expression and regulation in human intracellular infection correlate with Th1 cytokine patterns. J Immunol 2001; 167:5719-24.
90. Manandhar R, Shrestha N, Butlin CR, Roche PW. High levels of inflammatory cytokines are associated with poor clinical response to steroid treatment and recurrent episodes of type 1 reactions in leprosy. Clin Exp Immunol 2002;128: 333-8.

-
91. Ilangumaran S, Robinson P, Shankernarayan NP, Ramu G, Mahadevan PR, Muthukkaruppan VR. T lymphocyte reactivity of leprosy patients and healthy contacts from a leprosy-endemic population to delipidified cell components of *Mycobacterium leprae*. *Lepr Rev* 1994; 65: 34-44.
92. Shimizu T, Maw WW, Tomioka H. Roles of tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta in regulating intercellular adhesion molecule-1 expression on murine peritoneal macrophages infected with *M. leprae*. *Int J Lepr* 1999; 67: 36-45.
93. Hasan Z, Mahmood A, Zafar S, Khan AA, Hussain R. Leprosy patients with lepromatous disease have an up-regulated IL-8 response that is unlinked to TNF-alpha responses. *Int J Lepr* 2004; 72: 35-44.
94. Kang TJ, Yeum CE, Kim BC, You EY, Chae GT. Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunol* 2004; 112:674-80.
95. Kaplan G, Gandhi RR, Weinstein DE, Levis WR, Patarroyo ME, Brennan PJ, et al. *Mycobacterium leprae* antigen-induced suppression of T cell proliferation *in vitro*. *J Immunol* 1987; 138: 3028-34.
96. Prasad HK, Mishra RS, Nath I. Phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of *in vitro* concanavalin A responses unrelated to leprosy type. *J Exp Med* 1987; 165: 239-44.
97. Sibley LD, Franzblau SG, Krahenbuhl JL. Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infect Immun* 1987; 55: 680-5.

-
98. Nakamura C, Fukutomi Y, Kashiwabara Y, Oomoto Y, Kojima M, Hayashi H, et al. Dharmendra antigen but not integral *M. leprae* is an efficient inducer of immunostimulant cytokine production by human monocytes, and *M. leprae* lipids inhibit the cytokine production. *Int J Lepr* 1997; 65: 63-72.
 99. McHugh S, Deighton J, Rilltin I, Ewan P. Kinetics and functional implications of Th1 and Th2 cytokine production following activation of peripheral blood mononuclear cells in primary culture. *Eur J Immunol* 1996; 26: 1260-5.
 100. Torres M, Herrera T, Villareal H, Rich EA, Sada E. Cytokine Profiles for Peripheral Blood Lymphocytes from Patients with Active Pulmonary Tuberculosis and Healthy Household Contacts in Response to the 30-Kilodalton Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* *Infect Immun* 1998;66: 176-80.
 101. Vilani-Moreno FR, Lauris JR, Opromolla DV. Cytokine quantification in the supernatant of mononuclear cell cultures and in blood serum from patients with Jorge Lobo's disease. *Mycopathology* 2004; 158: 17-24.
 102. Sadahiro A, Diogo CL, Oshiro TM, Shikanai-Yasuda MA. Kinetics of IFN-gamma, TNF-alpha, IL-10 and IL-4 production by mononuclear cells stimulated with gp43 peptides, in patients cured of paracoccidioidomycosis. *Rev Soc Bras Med Trop* 2007; 40: 156-62.
 103. Boxel-Dezaire AH, Stark GR. Cell type-specific signaling in response to interferon-gamma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2007; 316:119-54.
 104. Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 2006; 85: 53-64.

-
105. Franco M, Peracoli MT, Soares A, Montenegro R, Mendes RP, Meira DA. Host-parasite relationship in paracoccidioidomycosis. *Curr Top Med Mycol* 1993; 5: 115-49.
 106. Britton WJ, Lockwood DN. Leprosy. *Lancet* 2004; 363: 1209-19.
 107. Lammas DA, De Heer E, Edgar JD, Novelli V, Ben-Smith A, Baretto R, et al. Heterogeneity in the granulomatous response to mycobacterial infection in patients with defined genetic mutations in the interleukin 12-dependent interferon-gamma production pathway. *Int J Exp Pathol* 2002; 83: 1-20.
 108. Iyer AM, Mohanty KK, van Egmond D, Katoch K, Faber WR, Das PK, Sengupta U. Leprosy-specific B-cells within cellular infiltrates in active leprosy lesions. *Hum Pathol*. 2007 Jul; 38:1065-73.
 109. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; 214: 149-60.
 110. Lin PL, Plessner HL, Voitenok NN, Flynn JL. Tumor necrosis factor and tuberculosis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2007;12: 22-5.
 111. Lockwood DN, Vinayakumar S, Stanley JN, McAdam KP, Colston MJ. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad. *Int J Lepr* 1993; 61: 8-15.
 112. Lienhardt C, Fine PEM. Type 1 reaction, neuritis and disability in leprosy: what is the current epidemiological picture? *Lepr Rev* 1994; 65: 9-33.
 113. Ridley DS. Reactions in leprosy. *Lepr Rev* 1969; 40: 77-81.

-
114. Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Marlowe S, Jain S, Reddy RG, Suneetha S, et al. Detection of IL-13, IL-10, and IL-6 in the leprosy skin lesions of patients during prednisolone treatment for type 1 (T1R) reactions. *Int J Lepr* 2004; 72:27-34.
 115. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA. Serum levels of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 1991; 84:103-8.
 116. Sampaio EP, Moreira AL, Sarno EN, Malta AM, Kaplan G. Prolonged treatment with recombinant interferon gamma induces erythema nodosum leprosum in lepromatous leprosy patients. *J Exp Med* 1992; 175: 1729-37.
 117. Couper KN, Blount GD, Riley EM. IL-10: the Master Regulator of Immunity to Infection. *J Immunol* 2008; 180: 5771-7.
 118. Moore KW, Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 683-765.
 119. Kamanaka M, Kim ST, Wan YY, Sutterwala FS, Lara-Tejero M, Galán JE, et al. Expression of interleukin-10 in intestinal lymphocytes detected by an interleukin-10 reporter knockin tiger mouse. *Immunity* 2006; 25: 941-52.
 120. O'Garra A, Vieira P. Th1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 425-8.
 121. Sieling PA, Modlin RL. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesions. *Springer Semin Immunopathol* 1992; 13: 413-26.

-
122. Salgame P, Abrams JS, Clayberger C, Goldstein H, Convit J, Modlin RL, et al. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 1991; 254: 279-82.
 123. Li MO, Wan YY, Sanjabi S, Robertson AK, Flavell RA. Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2006; 24: 99-146.
 124. Sadeghi HM, Schnelle JF, Thoma JK, Nishanian P, Fahey JL. Phenotypic and functional characteristics of circulating monocytes of elderly persons. *Exp Gerontol* 1999; 34: 959-70.
 125. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 523-32.
 126. Li MO, Flavell RA. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* 2008; 134:392-404.
 127. Wahl SM, McCartney-Francis N, Mergenhagen SE. Inflammatory and immunomodulatory roles of TGF-beta. *Immunol Today* 1989;10: 258-61.
 128. Kiszewski CA, Becerril E, Baquera J, Aguilar LD, Hernández-Pando R. Expression of transforming growth factor-beta isoforms and their receptors in lepromatous and tuberculoid leprosy. *Scand J Immunol* 2003; 57:279-85.
 129. Goulart IM, Mineo JR, Foss NT. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin Exp Immunol* 2000; 122:330-4.
 130. Toossi Z, Gogate P, Shiratsuchi H, Young T, Ellner JJ. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active

- tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. J Immunol 1995; 154: 465-73.
131. Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. J Exp Med 2001; 194: 1497-506.
132. Silva CL, Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. J Infect Dis 1989; 159: 787-90.
133. Peraçoli MT, Kurokawa CS, Calvi SA, Mendes RP, Pereira PC, Marques AS, et al. Production of pro- and anti-inflammatory cytokines by monocytes from patients with paracoccidioidomycosis. Microbes Infect 2003; 5: 413-8.
134. Al-Attayah R, Madi N, El-Shamy AS, Wiker H, Andersen P, Mustafa A. Cytokine profiles in tuberculosis patients and healthy subjects in response to complex and single antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol 2006; 47: 254-61
135. Parise-Fortes MR, Marques SA, Soares AM, Kurokawa CS, Marques ME, Peraçoli MT. Cytokines released from blood monocytes and expressed in mucocutaneous lesions of patients with paracoccidioidomycosis evaluated before and during trimethoprim-sulfamethoxazole treatment. Br J Dermatol 2006; 154: 643-50.
136. Moubasher AD, Kamel NA, Zedan H, Raheem DD. Cytokines in leprosy, I. Serum cytokine profile in leprosy. Int J Dermatol 1998; 37: 733-40.

-
137. Belgaumkar VA, Gokhale NR, Mahajan PM, Bharadwaj R, Pandit DP, Deshpande S. Circulating cytokine profiles in leprosy patients. *Lepr Rev* 2007; 78: 223-30
 138. Morosini M, Meloni F, Uccelli M, Marone Bianco A, Solari N, Fietta AM. Ex vivo evaluation of PPD-specific IFN- γ or IL-5 secreting cells in the peripheral blood and lungs of patients with tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 753-9
 139. Andrade Júnior DR, Santos SA, Andrade DR. Measurement of peripheral blood mononuclear cells producing IFN-Gamma in patients with tuberculosis. *Braz J Infect Dis* 2008; 12: 123-7.
 140. Benard G, Romano CC, Cacere CR, Juvenale M, Mendes-Giannini MJ, Duarte AJ. Imbalance of IL-2, IFN-gamma and IL-10 secretion in the immunosuppression associated with human paracoccidioidomycosis. *Cytokine* 2001; 13: 248-52.
 141. Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun* 2001; 69: 3413-7.
 142. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Brazilian Leprosy Study Group. In situ type 1 cytokine gene expression and mechanisms associated with early leprosy progression. *J Infect Dis* 2003;188: 1024-31.
 143. Weiss E, Mamelak AJ, La Morgia S, Wang B, Feliciani C, Tulli A, et al. The role of interleukin 10 in the pathogenesis and potential treatment of skin diseases. *J Am Acad Dermatol* 2004;50 :657-75.

-
144. Li MO, Flavell RA. Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *Immunity* 2008; 28: 468-76.
 145. Flad HD, Richter E, Schlüter C, Duchrow M, Arnoldi J, Hahn M et al. *Mycobacterium leprae* DNA content, cellular and cytokine patterns in skin lesions of leprosy patients undergoing multidrug therapy (MDT). *Immunobiology* 1994; 191: 388-94.
 146. Sugita Y, Miyamoto M, Koseki M, Ishii N, Nakajima H. Suppression of tumour necrosis factor-alpha expression in leprosy skin lesions during treatment for leprosy. *Br J Dermatol* 1997; 136: 393-7.
 147. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353-60.
 148. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC, et al. Systemic and Local Characterization of Regulatory T Cells in a Chronic Fungal Infection in Humans. *J Immunol* 2006; 177: 5811-8.
 149. Bava AJ, Mistchenko AS, Palacios MF, Estevez ME, Tiraboschi NI, Sen L, et al. Lymphocyte subpopulations and cytokine production in paracoccidioidomycosis patients. *Microbiol Immunol* 1991; 35: 167-74.
 150. Ridley DS. Skin biopsy in leprosy. Switzerland: Ciba-Geigy. 2 ed. 1987.
 151. Silva CL, Faccioli LH, Foss NT. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *Int J Lepr* 1993; 61: 107-8.

-
152. Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, Ellner JJ, Toossi Z. Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996; 64: 399-405.
 153. Phillips R, Horsfield C, Mangan J, Laing K, Etuaful S, Awuah P, et al. Cytokine mRNA expression in *Mycobacterium ulcerans*-infected human skin and correlation with local inflammatory response. *Infect Immun* 2006; 74: 2917-24.

Resumo

Visando contribuir para o melhor entendimento da participação das citocinas na hanseníase dimorfa, o presente estudo investigou a produção desses mediadores *in vitro* e *in situ* em pacientes dimorfos-tuberculóides (HDT) e dimorfos-virchovianos (HDV). Foram avaliados 7 pacientes HDT e 12 HDV, virgens de tratamento, além de 19 indivíduos saudáveis (grupo controle). Culturas de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram estimuladas ou não com estímulos inespecíficos e específicos do *M. leprae* (antígeno inteiro e sonificado) e após 48 horas o sobrenadante foi recolhido para dosagens das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β 1. Biópsias das lesões cutâneas foram submetidas aos procedimentos histológicos por meio da coloração com Hematoxilina-Eosina e Faraco-Fite; os cortes foram submetidos, ainda, à detecção *in situ* de iNOS, IL-10 e TGF- β 1 por imunistoquímica. A quantificação de citocinas em sobrenadante de PBMC revelou que pacientes HDT produziram níveis maiores de IFN- γ . Em comparação com indivíduos saudáveis, pacientes dimorfos produziram níveis menores de TGF- β 1 e pacientes HDV, níveis menores de IL-10. A expressão da enzima iNOS *in situ* foi maior nos pacientes HDT em comparação aos HDV; já a citocina TGF- β 1 foi expressa em maior número de células nos pacientes HDV; quanto à IL-10, não houve diferença significativa entre pacientes HDT e HDV. A correlação dos achados das lesões cutâneas revelou que nos pacientes HDV existe correlação negativa entre a expressão tecidual de TGF- β 1 e IL-10; independentemente da forma clínica foi observado correlação positiva entre TGF- β 1 e índice baciloscópico e correlação negativa entre a expressão tecidual de TGF- β 1 e iNOS. Os resultados revelaram, ainda, correlação positiva entre a expressão de iNOS tecidual e a produção de IFN- γ por PBMC estimuladas com antígenos do *M. leprae*. Em conjunto, as observações histopatológicas e imunológicas reforçam a idéia da instabilidade imunológica vista nos pacientes dimorfos e apontam a participação de perfis mistos de citocinas nesses pacientes, sobressaindo um perfil Th1 nos pacientes HDT e Th2 nos pacientes HDV, com uma possível participação de linfócitos T regulatórios.

Abstract

In order to contribute to a better understanding on the participation of cytokines on borderline leprosy, in the present study we determined the *in vitro* and *in situ* production of these mediators from non-treated borderline tuberculoid (BT) and borderline lepromatous (BL) patients. Seven BT non-treated patients, 12 BL non-treated patients, besides 19 healthy individuals (control group), were evaluated. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated or not with specific-*M leprae* stimulus (whole and sonicated *M. leprae* antigens) and non-specific stimulus; after 48 h the supernatant was collected to TNF- α , IFN- γ , IL-10 and TGF- β 1 cytokine determination by ELISA. Biopsies from cutaneous lesions were submitted to histological procedure and Hematoxylin-Eosin and Faraco-Fite staining; the sections were still submitted to iNOS, IL-10 and TGF- β 1 *in situ* detection by immunohistochemistry. The cytokines quantification in PBMC supernatants from patients showed that BT patients produced higher levels of IFN- γ . Compared to healthy individuals, both borderline patients group produced lower levels of TGF- β 1 and, BL patients, lower levels of IL-10. The *in situ* iNOS expression was higher in BT patients if compared to BL; on the other hand, TGF- β 1 cytokine was immunostained in larger number of cells in BL patients. In regards to IL-10 there was no significant difference between BT and BL patients. The correlation of findings in cutaneous lesions showed that in BL patients there was a negative correlation between the TGF- β 1 tissue expression and IL-10; independently of the clinical form, we observed a positive correlation between TGF- β 1 and bacterial index and a negative correlation between the TGF- β 1 tissue expression and iNOS. The results still showed a positive correlation between the iNOS tissue expression and the production of IFN- γ by PBMC stimulated with *M leprae* antigens. Taken together, the histopathological and immunological observations reinforce the idea of immunologic instability seen in borderline leprosy patients and pointing the participation of mixed profiles of cytokines in these patients, mainly a Th1 profile on BT patients and Th2 profile on BL patients, with a possible participation of T regulatory lymphocytes.

Apêndice

PRINCIPAIS REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

Reagente/material	Marca	Nº de catálogo
Albumina Bovina, fração V	Roche Diagnostics (Indianapolis, IN, USA)	775860
Antibiótico penicilina-estreptomicina	Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)	15140-148
Fitohemaglutinina (PHA-M)	Gibco BRL	10576-015
Polímero marcado com peroxidase, conjugado com anticorpo de cabra anti-IgG de camundongo (Kit EnVision ⁺)	Dako Cytomation (Carpinteria, CA, USA)	K4001
Polímero marcado com peroxidase, conjugado com anticorpo de cabra anti-IgG de coelho (Kit EnVision ⁺)	Dako Cytomation	K4003
Soro Bovino Fetal	Gibco BRL	10270-106
Tripsina	Sigma Chemical Co (St Louis, MO, USA)	T-7409
3,3 tetradidrocloreto de diaminobenzidina (DAB)	Sigma Chemical Co	D-5637
Sistema ABC (avidina-biotina-peroxidase)	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)	PK.6102
Histopaque 1,077	Sigma Chemical Co	1077-1
Lipopolissacaride da <i>E.coli</i> sorotipo 055:B5	Sigma Chemical Co	L-4005
Peróxido de Hidrogênio	Merck (Darmstadt, Germany)	7210
Placa de cultura 96 poços - Costar	Corning (New York, USA)	CLS3598
Placa de 96 poços - MaxiSorp	NUNC (Wiesbaden, Germany)	442404
3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzindina (TMB)	Sigma Chemical Co	T-2885
Lâminas silanizadas	Dako	S3003

PRINCIPAIS SOLUÇÕES UTILIZADAS

- Solução Salina Tamponada (SST)

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
8,1 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4
(pH 7,2-7,4)

- Tampão de Lavagem - ELISA

0,05% Tween 20 em SST
(pH 7,2-7,4)

- Tampão de Bloqueio - ELISA

Ensaio	Tampão de Bloqueio
TNF- α	1% BSA em SST
IL-10	1% BSA em SST
TGF- β 1	5% de Tween 20 em SST
IFN- γ	1% BSA em SST com 0,05% NaN_3

(pH 7,2-7,4)

- Tampão Diluente - ELISA

Ensaio	Tampão Diluente
TNF- α	1% BSA em SST
IL-10	1% BSA em SST
TGF- β 1	1,4 % de reagente diluente concentrado 1x (R&D Systems - cód. DY 997) em 0,05% Tween 20 em SST
IFN- γ	0,1% de BSA em 0,05% de Tween 20 em Tampão-Tris Salina (20 mM Trizma base, 150 mM NaCl)

(pH 7,2-7,4)

- Solução Reveladora - ELISA

1% de tetrametilbenzidina (TMB) diluído em dimetilsulfóxido (DMSO)
 0,1 M ácido cítrico/acetato de sódio
 0,16% de H₂O₂ 30 vol

- Valores máximos e mínimos das amostras padrão - ELISA

Ensaio	Valores maiores e menores das amostras padrão (pg/ml)
TNF- α	1000 - 17,25
IL-10	2000 - 32,5
TGF- β 1	2000 - 32,5
IFN- γ	1000 - 17,25

- Valores da concentração de trabalho dos anticorpos de detecção - ELISA

Anticorpo de detecção	Concentração de Trabalho
Anticorpo biotinilado anti-TNF- α humano, produzido em cabra	250 ng/ml
Anticorpo biotinilado anti-IL-10 humana, produzido em cabra	200 ng/ml
Anticorpo biotinilado anti-TGF- β 1 humano, produzido em cabra	300 ng/ml
Anticorpo biotinilado anti-IFN- γ humano, produzido em cabra	75 ng/ml

TABELAS

Tabela 1. Índice Baciloscópico das lesões dos pacientes com hanseníase dimorfa-tuberculóide (HDT) e hanseníase dimorfa-virchoviana (HDV). Os valores estão expressos de acordo com a classificação proposta por Ridley (1967) em escala de 0 - 6+.

Pacientes	Forma Clínica	IB
1	HDT	0
2	HDT	0
3	HDT	0
4	HDT	1
5	HDT	0
6	HDT	0
7	HDT	1
Mediana(1ºQ; 3ºQ)		0 (0;0)
8	HDV	5
9	HDV	5
10	HDV	2
11	HDV	5
12	HDV	2
13	HDV	5
14	HDV	4
15	HDV	5
16	HDV	4
17	HDV	4
18	HDV	3
19	HDV	6
Mediana(1ºQ; 3ºQ)		4 (3;5)

Tabela 2. Análise semiquantitativa (0 - 4+) referente a produção de iNOS e das citocinas IL-10 e TGF- β 1 nas lesões dos pacientes HDT e HDV.

Pacientes	Forma Clínica	IL-10	iNOS	TGF- β 1
1	HDT	1	4	1
2	HDT	2	3	1
3	HDT	2	1	3
4	HDT	2	4	1
5	HDT	2	3	2
6	HDT	2	3	2
7	HDT	4	3	1
Mediana (1ºQ; 3ºQ)		2 (2;2)	3 (3;4)	1 (1;2)
8	HDV	2	1	3
9	HDV	1	3	3
10	HDV	NR	NR	NR
11	HDV	2	2	4
12	HDV	NR	NR	NR
13	HDV	4	3	2
14	HDV	3	3	1
15	HDV	3	2	3
16	HDV	4	2	2
17	HDV	3	2	3
18	HDV	3	1	2
19	HDV	2	1	3
Mediana (1ºQ; 3ºQ)		3 (2;3)	2 (1;3)	3 (2;3)

Tabela 3. Quantificação de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HDT. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Pacientes	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
1	1217,8	808,1	430,5	350,3	930,0	122,1
2	954,5	1014,7	301,3	830,5	1010,7	42,6
3	1234,2	1134,2	311,2	554,5	992,3	158,4
4	945,0	1325,4	1122,6	1118,5	1241,1	626,4
5	1239,7	830,6	521,0	627,1	604,6	471,2
6	1311,7	1205,5	989,6	1070,5	1253,5	616,8
7	1232,2	1239,0	958,1	1050,6	NR	646,6
Mediana	1232,2	1134,2	521,0	830,5	1001,5	471,2
Média	1162,2	1079,6	662,0	800,3	1005,4	383,4
Desvio-padrão	148,2	201,9	349,7	297,4	238,2	266,3

Tabela 4. Quantificação de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HDV. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Pacientes	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
8	1135,6	904,6	395,5	438,7	1090,3	165,2
9	1004,4	896,5	732,6	882,2	974,5	415,0
10	1572,3	931,7	685,6	799,9	944,1	455,6
11	1626,9	1160,4	381,7	781,3	1312,8	NR
12	1233,5	1272,6	1222,6	1267,8	1225,3	513,0
13	1513,6	1608,4	1364,3	1532,1	1481,7	525,1
14	1206,7	1551,7	1017,2	1265,4	1554,8	189,3
15	1431,3	1449,7	1211,8	1385,9	1287,0	350,6
16	867,0	1162,3	694,3	615,5	1189,7	234,4
17	1114,3	1265,7	202,3	1074,6	1184,9	63,4
18	1200,0	866,3	127,8	723,7	209,8	144,7
19	1205,5	1028,0	894,4	901,9	1189,0	71,4
Mediana	1206,1	1161,4	713,5	892,1	1189,4	234,4
Média	1259,3	1174,8	744,2	972,4	1137,0	284,3
Desvio-padrão	232,1	261,1	411,4	333,2	342,2	174,2

Tabela 5. Quantificação de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis referentes ao grupo controle dos pacientes HDT. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Indivíduos	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
C1	1568,2	1087,2	530,0	854,5	957,5	509,6
C2	1577,9	1499,7	658,4	992,9	1126,6	356,9
C3	1138,5	743,5	285,0	341,2	700,2	159,9
C4	1374,7	1029,9	702,8	565,2	1244,7	166,8
C5	1524,9	1117,2	593,7	547,6	1316,8	423,1
C6	1517,3	1310,1	1238,8	1289,1	1260,6	532,6
C7	1625,4	993,9	681,2	936,5	1033,5	399,9
Mediana	1524,9	1087,2	658,4	854,5	1126,6	399,9
Média	1475,3	1111,6	670,0	789,6	1091,4	364,1
Desvio-padrão	168,1	240,4	288,2	323,2	215,4	150,0

Tabela 6. Quantificação de TNF- α em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis referentes ao grupo controle dos HDV. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Indivíduos	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
C8	1092,4	1233,5	994,5	991,5	1374,6	286,2
C9	1004,9	921,8	541,6	436,1	1003,2	289,8
C10	1238,4	814,8	345,6	510,9	1099,9	181,4
C11	1065,2	980,3	653,4	1005,5	954,5	309,8
C12	1269,8	1499,7	722,9	842,0	1353,7	401,7
C13	1268,1	995,9	414,9	536,7	1162,2	238,2
C14	1647,2	1461,1	1422,5	1457,2	1531,4	770,2
C15	996,3	916,0	770,4	992,9	1067,5	267,1
C16	1522,5	1272,1	984,0	1060,3	1210,7	601,9
C17	1411,6	1470,3	746,4	954,4	1388,9	500,0
C18	967,0	1111,3	729,6	657,5	1193,5	327,9
C19	1237,0	1256,2	943,7	690,8	1115,7	199,2
Mediana	1237,7	1172,4	738,0	898,2	1177,9	299,8
Média	1226,7	1161,1	772,5	844,6	1204,7	364,4
Desvio-padrão	216,6	238,7	290,5	291,6	174,4	176,6

Tabela 7. Quantificação de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HDT. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Pacientes	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
1	2908,8	18,3	11,7	17,7	88,8	0,0
2	406,4	3,7	0,0	4,46	16,9	0,0
3	2795,7	36,9	0,0	11,7	19,0	0,0
4	913,9	0,0	1,62	0,54	11,8	0,0
5	1669,5	0,0	0,0	11,0	17,7	0,0
6	1368,0	0,0	7,0	14,5	97,5	58,3
7	NR	NR	NR	NR	NR	0,0
Mediana	1518,8	1,9	0,8	11,4	18,4	0,0
Média	1677,1	9,8	3,4	10,0	42,0	8,3
Desvio-padrão	1006,1	15,1	4,9	6,4	39,8	22,0

Tabela 8. Quantificação de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HDV. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Pacientes	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
8	1994,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
9	1033,8	2,05	0,0	0,0	3,5	3,5
10	2793,8	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0
11	1523,1	0,0	0,0	1,1	0,6	NR
12	2114,5	27,4	29,6	NR	21,0	25,0
13	993,9	66,7	7,2	0	14,3	0,6
14	1385,5	5,7	0,0	0,0	38,0	0,0
15	346,0	0,0	0,0	1,7	22,2	4,7
16	301,6	5,4	3,2	3,2	3,7	2,2
17	2215,5	0,0	5,3	5,9	12,4	4,8
18	2793,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
19	2403,5	0,0	3,2	0,0	0,0	0,5
Mediana	1758,6	1,0	0,0	0,0	3,6	0,6
Média	1658,2	9,1	4,0	1,1	9,6	3,8
Desvio-padrão	866,1	19,7	8,4	1,9	12,2	7,3

Tabela 9. Quantificação de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis referentes ao grupo controle dos pacientes HDT. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Indivíduos	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
C1	2406,6	57,4	0,7	6,5	27,3	0,0
C2	632,6	22,2	0,0	0,0	14,2	0,0
C3	754,8	0,9	0,0	0,0	0,6	0,0
C4	2367,0	27,7	1,0	0,0	13,8	0,0
C5	2794,6	102,1	11,6	11,6	279,1	9,2
C6	2873,7	43,8	20,8	57,2	482,5	0,0
C7	1000,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Mediana	2367,0	27,7	0,7	0,0	14,2	0,0
Média	1832,9	36,3	4,9	10,8	116,8	1,3
Desvio-padrão	993,1	35,8	8,2	21,0	189,9	3,5

Tabela 10. Quantificação de IFN- γ em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis referentes ao grupo controle dos pacientes HDV. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Indivíduos	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
C8	628,2	19,4	1,1	0,0	11,5	0,0
C9	1244,4	1,1	1,5	0,0	1,9	0,0
C10	2507,4	58,6	3,3	8,4	28,8	0,0
C11	1992,9	5,4	0,6	11,7	4,3	0,7
C12	658,8	87,9	0,0	0,0	0,0	0,0
C13	1398,2	8,4	0,0	0,0	39,7	0,0
C14	2811,6	3,0	0,0	0,0	2,2	0,0
C15	1418,5	11,7	0,2	2,2	33,9	0,0
C16	1526,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
C17	2202,7	131,7	0,0	7,7	16,6	0,0
C18	177,0	4,8	0,0	0,0	6,0	0,0
C19	2932,7	55,0	41,6	12,4	21,7	0,0
Mediana	1472,4	10,1	0,1	0,0	8,8	0,0
Média	1624,9	32,3	4,0	3,5	13,9	0,1
Desvio-padrão	886,2	42,3	11,9	5,0	14,1	0,2

Tabela 11. Quantificação de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HDT. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Pacientes	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
1	1438,1	949,6	572,0	345,9	1117,0	370,8
2	2951,3	1182,2	438,0	782,9	1424,9	12,4
3	1693,6	2367,5	291,6	325,5	1449,4	475,9
4	3958,7	3916,2	2807,7	2666,6	3459,4	1819,2
5	2324,5	1820,2	1202,9	1408,7	1847,4	1475,5
6	1712,7	743,1	843,9	881,9	873,0	436,5
7	3378,7	NR	2225,5	1641,1	NR	1914,4
Mediana	2324,5	1501,2	843,9	881,9	1437,1	475,9
Média	2494,0	1829,8	1197,4	1150,4	1695,2	929,2
Desvio-padrão	960,2	1184,7	962,9	830,8	925,1	781,2

Tabela 12. Quantificação de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HDV. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Pacientes	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
8	1747,9	1944,6	714,5	845,6	2320,0	806,1
9	1293,4	924,5	919,4	1273,2	992,1	159,0
10	2252,4	1850,6	1133,6	1238,1	1733,0	1202,1
11	1113,9	1783,6	364,3	952,3	1198,9	NR
12	2317,3	1665,7	673,7	36,1	1890,4	684,0
13	232,0	1251,2	857,6	1326,3	1084,6	150,3
14	1380,2	2471,2	1355,7	1897,9	2502,3	220,5
15	2665,6	2276,9	1618,7	1891,4	2458,4	416,3
16	1750,8	1891,9	758,8	709,5	2140,4	343,6
17	1403,7	2203,1	42,2	864,0	2554,7	36,8
18	3344,4	3233,6	409,2	1491,6	452,1	556,2
19	1627,6	1287,3	698,3	1005,1	2019,5	41,0
Mediana	1687,8	1871,2	736,6	1121,6	1954,9	343,6
Média	1760,8	1898,7	795,5	1127,6	1778,9	419,6
Desvio-padrão	805,8	614,9	432,7	517,3	692,9	364,1

Tabela 13. Quantificação de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis referentes ao grupo controle dos pacientes HDT. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Indivíduos	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
C1	1825,3	1226,7	1744,4	1775,5	1025,8	650,3
C2	2052,4	2019,7	863,5	1123,4	1498,4	685,4
C3	1154,5	1549,8	555,0	423,6	1285,2	268,9
C4	1936,8	2172,6	888,0	503,6	1755,3	396,8
C5	886,6	778,0	213,5	216,4	846,5	381,1
C6	2191,2	2189,7	1865,4	1954,0	2031,1	1187,0
C7	1157,6	444,9	672,1	815,3	723,5	458,2
Mediana	1825,3	1549,8	863,5	815,3	1285,2	458,2
Média	1600,6	1483,0	971,7	973,1	1309,4	575,4
Desvio-padrão	519,9	696,2	612,7	676,8	482,0	308,0

Tabela 14. Quantificação de IL-10 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis referentes ao grupo controle dos pacientes HDV. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Indivíduos	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
C8	2518,6	2592,1	1953,5	2022,1	2278,5	1174,4
C9	1576,5	1985,9	681,8	540,3	2081,9	474,9
C10	2094,4	2145,7	1703,8	1442,4	1739,6	607,6
C11	2627,8	1323,8	540,3	414,0	990,2	525,4
C12	2491,3	2652,7	1038,0	1293,8	2129,7	745,5
C13	2379,1	2195,5	1168,5	919,5	2100,6	859,7
C14	1781,6	146,2	1070,5	840,2	1213,6	869,8
C15	1293,4	1682,6	1030,6	1071,0	1536,1	576,0
C16	2344,9	1878,1	1862,5	1761,4	1836,1	1157,7
C17	2081,1	2036,8	673,6	878,0	1607,3	736,8
C18	2338,4	2629,9	1442,4	1448,1	2495,5	841,2
C19	3504,9	2853,7	2193,4	1585,1	2892,1	1146,4
Mediana	2341,6	2091,3	1119,5	1182,4	1959,0	793,4
Média	2252,7	2010,3	1279,9	1184,7	1908,4	809,6
Desvio-padrão	565,9	736,8	546,3	490,5	535,5	247,2

Tabela 15. Quantificação de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HDT. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Pacientes	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
1	1169,6	1118,3	1127,3	1204,9	1062,9	659,4
2	1474,9	1438,3	1726,0	1540,3	1253,9	1023,1
3	1030,6	1077,0	1016,5	794,0	767,8	678,0
4	1227,8	1320,3	1197,6	1145,6	1180,6	712,6
5	1333,8	1233,1	1323,7	1353,9	1278,4	699,2
6	648,0	452,6	570,6	595,1	339,3	430,2
7	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Mediana	1198,7	1175,7	1162,5	1175,3	1121,8	688,6
Média	1447,8	1106,6	1160,3	1105,6	980,5	700,4
Desvio-padrão	287,1	346,5	352,1	321,4	365,2	189,5

Tabela 16. Quantificação de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de pacientes HDV. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Pacientes	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
8	1302,6	1059,9	1246,2	1240,1	1222,0	701,7
9	1614,8	1457,9	1584,8	1671,1	1396,5	971,6
10	1889,0	1079,6	1877,4	338,0	1251,4	1004,5
11	1886,1	2098,7	1379,8	1260,1	1367,6	NR
12	566,8	511,1	479,0	427,4	465,7	614,0
13	2433,5	2937,2	2419,0	2223,9	2421,9	1355,1
14	2392,8	2241,4	2561,6	2739,3	2582,0	1400,1
15	988,7	1839,5	1871,6	2022,0	1924,1	1083,32
16	1021,0	913,4	1069,2	1125,8	1094,7	605,4
17	994,6	1133,4	984,2	991,7	1029,5	595,0
18	1327,7	1447,6	1305,6	1203,9	1225,0	760,5
19	955,9	953,0	974,7	1136,2	901,1	537,9
Mediana	1315,2	1290,5	1342,7	1222,0	1238,2	760,5
Média	1447,8	1472,7	1479,4	1365,0	1406,8	875,4
Desvio-padrão	597,8	688,2	613,5	699,8	614,5	308,5

Tabela 17. Quantificação de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis referentes ao grupo controle dos pacientes HDT. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Indivíduos	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
C1	1431,9	1731,8	1455,2	1420,3	1932,7	1191,85
C2	890,8	709,5	872,6	876,3	311,6	601,05
C3	1841,1	1949,6	1953,5	1916,7	1890,8	1198,1
C4	1740,8	1861,3	1750,7	1718,7	1542,9	1104,0
C5	1502,3	1477,7	1603,1	1609,3	1360,9	941,1
C6	1557,6	1479,0	1475,3	1572,4	1384,3	968,1
C7	2214,1	2373,6	2460,7	2758,0	2525,9	1236,7
Mediana	1557,6	1731,8	1603,1	1609,3	1542,9	1104,0
Média	1597,0	1654,6	1653,0	1696,0	1564,2	1034,4
Desvio-padrão	407,8	517,7	489,0	569,8	684,4	223,0

Tabela 18. Quantificação de TGF- β 1 em sobrenadante de cultura de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis referentes ao grupo controle dos pacientes HDV. Valores expressos como mediana da concentração, em pg/ml.

Indivíduos	PHA	LPS	Ag2	Ag8	AgSon	CC
C8	2343,3	1507,6	2177,3	2101,6	1958,9	1109,1
C9	1780,9	1745,6	1750,8	1816,2	1711,6	1061,8
C10	2696,3	2671,0	3113,3	2913,9	2736,2	1640,0
C11	1537,7	1386,0	1461,8	1532,5	1332,4	678,51
C12	1906,8	1956,0	1865,0	1828,1	1999,0	1163,0
C13	2279,4	2069,1	2152,5	2069,1	2283,0	1587,5
C14	2119,9	2196,0	2032,8	1938,6	2583,9	1404,3
C15	1563,8	1774,4	1728,6	1902,5	1587,4	1038,9
C16	1869,7	1648,5	1887,8	1844,3	1764,5	1244,9
C17	1434,7	1394,1	1289,6	1299,4	1337,6	789,2
C18	2031,0	1990,4	2188,4	2230,2	2126,9	1142,1
C19	1165,6	1203,9	1039,7	1006,5	1056,8	794,8
Mediana	1888,3	1760,0	1876,4	1873,4	1861,7	1125,6
Média	1894,1	1795,2	1890,6	1873,6	1873,2	1137,8
Desvio-padrão	432,2	410,3	528,3	477,6	510,9	302,1

Anexos

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

CAIXA POSTAL 3021 – CEP: 17034-971 – BAURU – SP – BRASIL
FONE: 55 14 3103-5852 – 3103-5856
FAX: 55 14 3103-5914 – 3103-5856

COMITÊ DE ÉTICA EM
PESQUISA

CT.: C.E.P. nº 007/2006

Bauru, 13 de Abril de 2006

Ilmos. Srs.

Dra. Fátima Regina Vilani Moreno**James Venturini**

Instituto Lauro de Souza Lima

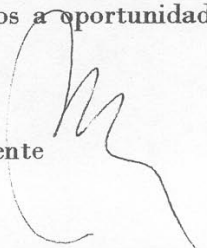
Bauru - SP

Prezados Senhores

O projeto de pesquisa intitulado “HANSENÍASE DIMORFA: PERFIL DE CITOCINAS EM SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS MONONUCLEARES E *IN SITU*.”, protocolo nº 0001/06, após retificações sugeridas, recebeu do relator *parecer favorável* e foi considerado **APROVADO** neste CEP, em reunião de 10/04/06.

Aproveitamos a oportunidade para renovar meus protestos de elevado apreço.

Atenciosamente


Dr. José Fernando Casquel Monti

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Instituto Lauro de Souza Lima

Title: *In situ* and *in vitro* cytokine profile in borderline tuberculoid and borderline lepromatous leprosy.

Short Title: Cytokine profile in borderline leprosy

James Venturini*, Cléverson Teixeira Soares**, Andréa de Faria Fernandes Belone**, Jaison Antonio Barreto***, Somei Ura****, José Roberto Pereira Lauris*****, Fátima Regina Vilani-Moreno*****

*Programa de Pós-Graduação em Doenças Tropicais, Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, SP, Brazil

**Equipe Técnica de Patologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brazil

***Serviço de Epidemiologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brazil

****Divisão de Pesquisa e Ensino, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brazil

*****Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, SP, Brazil

*****Equipe Técnica de Biologia, Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brazil

Correspondence to: Fátima Regina Vilani Moreno, Instituto Lauro de Souza Lima, Rod. Cmte. João Ribeiro de Barros, Km 225/226, 17034-971 Bauru, SP, Brazil. Phone: +55 14 31035912 Fax: +55 14 31035914. E-mail: fmoreno@ilsl.br

Abstract

Objective In order to contribute to a better understanding on the participation of cytokines on borderline leprosy, in the present study we investigated the *in vitro* and *in situ* production of these mediators in non-treated borderline tuberculoid (BT) and borderline lepromatous (BL) patients.

Patients and Methods Seven non-treated BT patients and 12 non-treated BL patients classified according to Ridley & Jopling were studied. The cytokines IFN- γ , IL-10, TGF- β 1 and TNF- α from supernatant of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultures were examined. Biopsies from cutaneous lesions were submitted to *in situ* detection of iNOS, IL-10 and TGF- β 1 by immunohistochemistry.

Results The quantification of cytokines in PBMC showed that BT patients produced higher levels of IFN- γ than BL patients; *in situ* iNOS expression was also higher in BT patients. TGF- β 1 was expressed a larger number of cells in BL patients; IL-10 expression was similar in both groups. Results show negative correlation between iNOS and TGF- β 1 tissue expression, positive correlation between TGF- β 1 and bacillary index, as well as positive correlation between tissue iNOS and PBMC IFN- γ production.

Conclusions All together, histopathological and immunological observations reinforce the idea of immunologic instability seen in the borderline group and point to a mixed cytokines profiles participation in those patients, mainly a Th1-profile in BT and Th2 in BL with a possible participation of T regulatory lymphocytes.

Introduction

Leprosy is characterized by a broad clinical, histopathologic, bacteriologic and immunologic spectrum which are related to the host response to *M. leprae*.^{1,2} The correlation of the polar forms of the disease with the presence of cytokines produced by T-cell subsets has been documented. Tuberculoid patients (TT) exhibit Th1 profile cytokines production such as interleukin-2 (IL-2) and IFN- γ ; whereas lepromatous patients (LL) are associated with the increased expression of Th2 profile cytokines, IL-4, IL-5 and IL-10.³⁻⁷ Between these two poles, borderline leprosy patients usually show less stable immunological response specific to *M. leprae*. Consequently, these patients exhibit clinical, bacteriological and histopathological characteristics that are closely related to the profile observed in the polar forms of the disease.¹

The quantification of cytokines in the polar forms of leprosy is well established, however, the data are scarce in the borderline group. In general, sample size is small and there is a tendency of researcher to group the results of BT with TT patients^{8,9}, BL patients with BB⁸ or with LL patients¹⁰ mainly when using peripheral blood mononuclear cells (PBMC) cultures. Misra *et al.*¹¹ verified Th1 and Th0 profiles in BT patients, while BL patients exhibited Th2 and Th0 profiles in PBMC culture supernatant obtained from 7 patients.

Studies on cytokines detection in cutaneous lesions are also scarce. McClean *et al.*¹² described that although the lesions from BT patients showed greater number of CD4⁺ cells and BL patients CD8⁺ cells, they did

not show significant differences in the of IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4 and IL-6 production. Goulart *et al.*¹⁰ verified intense immunostaining of TGF- β in the subgroup of minor resistance (BL) and suggested that this cytokine interferes with formation of granulomatous lesion and with macrophage microbicidal activity. As no immunostained cells were observed in the subgroup of higher resistance (BT), the same authors attributed this finding to *M. leprae* specific cell-mediated immune (CMI) response which determined macrophages differentiation and epithelioid granulomas formation which would be capable of eliminating most of bacilli. Nevertheless, these data was not confirmed by Khanolkar-Young *et al.*¹³, who verified positivity for TGF- β in BT patients. Recently, Anderson *et al.*¹⁴ verified the presence of this cytokine in 10-30% of cells present on granulomas from 4 borderline patients; the patients, however, were grouped as BT/BL, rendering impossible comparisons with previous data. Schon *et al.*¹⁵ verified the presence of iNOS in lesions of BT and BL patients and described that only lesions of BT patients exhibited more than 20% of immunostained cells. Diverging from these findings, Khanolkar-Young *et al.*¹³ did not find this enzyme present in cutaneous lesions of BT patients.

Considering that the presence of those mediators have been evaluated just in cell culture supernatants or just in cutaneous lesions, and there is no study where both aspects were concomitantly evaluated, and that BT or BL patients are frequently characterized by comparisons with polar forms of diseases, the objective of this study was to evaluate the role of macrophagic and lymphocytic cytokines (TNF- α , TGF- β 1, IL-10 and IFN- γ) in the immune response in non-treated borderline patients. Furthermore, this

study aimed at correlating the *in situ* cytokines results with the presence of acid-fast bacilli (AFB) in lesions, as well as to correlate the results of PBMC supernatant with those found *in situ*.

Materials and Methods

Patients. Nineteen non-treated leprosy patients were refereed and diagnosed at Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, Brazil and classified according to Ridley & Jopling.¹ Seven of these patients were classified as BT, three of which were male and four female, with mean age 38,3 years. Twelve patients were classified as BL, ten were male and two female, the mean age of this group was 49,1 years. Twenty milliliters of venous blood were collected from each patient in Vacutainer® tubes (BD Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) containing heparin anticoagulant. A 5 mm punch biopsy was collected for classification of patients and immunohistochemical analysis.

PBMC culture. Mononuclear cells were separated by Ficoll-Hypaque¹⁶ (Sigma, St Louis, MO, USA) density gradient and suspended in 1 ml RPMI-1640 medium containing L-glutamine and 25 mM HEPES buffer (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco), penicillin (100 UI/ml) and streptomycin (100 µg/ml) (Gibco). The total number of mononuclear cells was determined in a Neubauer chamber by 1:2 dilution of the cell suspension with 5% Turk dye in 4% glacial acetic acid. The final concentration was adjusted to 2×10^6 mononuclear cells/ml. The viability of the cell suspensions was determined with 0.1% Trypan blue in

buffered saline solution, pH 7.2. The cell suspension (100 µl/well) was distributed in 96-well, flat-bottom tissue culture plates (Corning, New York, NJ, USA) in the presence of 8 µg/ml PHA-M (Gibco), 10 µg/ml *E. coli* lipopolysaccharide (Sigma, St Louis, MO, USA), 10 µg/ml of *M. leprae* sonicated antigen (MLSON) and 4 µg/ml of whole *M. leprae* antigen (8 bacilli:1 mononuclear cell – WML). The antigens were provided by Dr. Patrick Brennan, Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, USA. Control cultures (CC) were not stimulated. Plates were incubated at 37°C in an atmosphere with 5% CO₂ for 48 h. After incubation, the cell suspensions were transferred to tubes and centrifuged at 1500 rpm for 10 min. The supernatants were collected, aliquoted and stored at -70 °C for cytokine determination.

Quantification of cytokines in supernatants of PBMC. The cytokines IL-10, TGF-β1, IFN-γ and TNF-α present in the mononuclear cell culture supernatant were quantified by ELISA using Cytokine Duo-Set Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA). The results are reported as pg/ml based on the standard curve established for each assay.

Detection of IL-10 and TGF- β1 cytokines and iNOS enzyme in cutaneous lesions. The IL-10, TGF-β1 and iNOS were detected by immunohistochemistry. Serial 4 µm thick sections were mounted on silane slides (Dako, Carpinteria, CA, USA). The primary antibodies used were anti-IL-10 monoclonal antibody (R&D Systems), anti-TGF-β1 (R&D Systems) and anti-iNOS polyclonal antibodies (Santa Cruz, San Diego, CA, USA), diluted respectively at 1:10, 1:50 and 1:250. After endogenous peroxidases blocking with 3% hydrogen peroxide in phosphate-buffered

saline (PBS) pH 7.4 for 30 minutes, the slides were incubated with trypsin (Sigma) 0,25% in PBS or with 10 mM citrate buffer, pH 6.0. The slides were incubated with the primary antibodies overnight at 4 °C. For IL-10 and iNOS detection samples were incubated for 30 minutes with the mouse and rabbit Dako EnVision⁺ System respectively. For TGF- β 1 marker, the slides were incubated with goat anti-IgG rabbit biotinalated antibody (Dako) for 60 minutes followed by incubation with the ABC complex (avidin-biotyne-peroxidase) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) for 45 minutes. After, 1 mg/ml DAB solution (3,3' tetrahydrochloride diaminobenzidine; Sigma, USA) in PBS pH 7.4, plus 1% hydrogen peroxide (Merck) for 5 minutes. The slides were counterstained with Harris's hematoxylin and mounted in Permount resin. Between each step slides were washed with PBS. Previously characterized microscopic sections from cutaneous lesions of patients with Jorge Lobo's disease¹⁷, were adopted as positive controls. The negative controls used were: 1) samples in which the primary antibody was omitted; 2) sections incubated with normal goat and rabbit serum replacing the primary antibodies; 3) microscopic sections of normal mammary skin from plastic surgery. Positive labeling was identified as a brown staining on the cell cytoplasm.

Histopathologic evaluation. Histological sections (4 μ m) were stained with Hematoxilin-Eosin (HE) and Faraco-Fite.^{18,19} The AFB were evaluated using a scale of 0 to 6+, according to Ridley.²⁰ The histological sections submitted to immunohistochemistry were evaluated by three independent observers, in a semi-quantitative scale ranging from 0 to 4+. The score 0 was considered negative; 1+, minimum; 2+, discrete; 3+, moderate and 4+,

intense.^{17,21,22}

Statistic analysis. To determine whether there was a significant difference in the cytokine levels of cell culture supernatants between BT and BL patients, the data were analyzed by T Student test. The non-parametric Mann-Whitney test was used to determine whether there was a difference of cytokines and iNOS expression in lesions from BT and BL patients. Spearman correlation coefficient was calculated to verify the correlation between cytokines in culture cell supernatants and cutaneous lesions and the same test was used to determine whether there was correlation of cytokines in cutaneous lesions and the number of AFB. In all analyses, the level of significance was set at $p < 0.05$.²³

Results

The analysis of the histopathological sections revealed that BT patients showed epithelioid cells granulomas in the centre with peripheral lymphohistiocytic halo. The epithelioid cells appeared in a loose tuberculoid arrangement scattered by small numbers of lymphocytes. The peripheral halo was constituted mainly by lymphocytes, in small number histiocytes and plasma cell. Some of the granulomas showed foreign body and Langhans giant cells (Figure 1A). In lesions from BL patients, the granulomas were formed by non-epithelioid cells and scattered lymphocytes. Lymphocytes appeared in clusters or disposed as bundles upon the inflammatory infiltrate (Figure 1B). The bacterial index (BI) of

cutaneous lesions ranged from 0 to 1+ (median 0) in BT patients and from 2 to 6+ (median 4+) ($p < 0.001$) in BL patients (Figure 2A).

The IL-10 marker was detected in mononuclear cells, showing granular pattern, especially on the periphery of granulomas (Figures 1C and 1D). The presence of this cytokine in lesions was more evident in BL patients (median 3+) than in BT patients (median 2+) (Figure 2B). The TGF- β 1 was predominantly detected in histiocytes on a homogeneous and diffuse pattern, mainly in lesions of BL patients (median 3+); in BT patients, this cytokine was detected in a small number of cells (median 1+) (Figure 1E and 1F). The statistic analysis demonstrated significant difference between BT and BL patients ($p = 0.033$) (Figure 2C). The iNOS production was significantly higher in BT patients (median 3+) than in BL patients (median 2+) ($p = 0.043$) (Figure 2D). The iNOS positive cells were histiocytes, epithelioid cells and multinuclear giant cells present on granulomas (Figures 1G and 1H).

A negative correlation was demonstrated between IL-10 and TGF- β 1 in BL patients ($r = -0.68$; $p = 0.03$). There was no other correlation in respect to the other evaluated parameters. Independently on the clinical forms, we demonstrated a positive correlation between TGF- β 1 and BI ($r = 0.563$; $p = 0.029$) and negative correlation between TGF- β 1 and iNOS ($r = -0.705$; $p = 0.002$).

The analysis of cytokines in PBMC supernatants showed higher levels of IFN- γ in BT patients compared to BL patients in *M. leprae*-stimulated cultures ($p < 0.05$) (Table 1). The production of IL-10, TGF- β 1 and TNF- α , independently of the stimulus, was not statistically significant

between BT and BL groups. The production of cytokines was higher in culture cells supernatants stimulated by *M. leprae*-specific (MLSON and WML) and non-specific stimulus when compared to non-stimulated cultures ($p<0.05$) (Table 1).

The correlation between the levels of IFN- γ , IL-10 and TGF- β 1 in PBMC supernatants and the iNOS, IL-10 and TGF- β 1 tissue expression in lesions from patients showed positive correlation between the IFN- γ production of MLSON-stimulated culture cells supernatants and the iNOS tissue expression ($r=0.55$; $p=0.027$). On the other evaluated parameters, there was no correlation.

Discussion

The immunological paradigm of tuberculoid and lepromatous leprosy clinical forms is well established; however, in the borderline group patients show immunological instability and present several varied clinical, bacteriological and histopathological features. In this group of patients, approximately 40% are prone to developing type I or type II reactions²⁴, before, during or after the treatment, that may lead to neural damage and physical disabilities.

Our results demonstrated higher iNOS production in cutaneous lesions from BT patients, as well as higher IFN- γ levels in PBMC supernatants. It should be mentioned that iNOS may be used as a marker of CMI response and indicator of IFN- γ production.²⁵ Therefore, BT patients show more efficient *M. leprae* specific CMI response than BL patients, with

production of reactive oxygen intermediates (ROI) and reactive nitrogen intermediates (RNI) and consequently killing of bacilli. The finding of BI ranging from 0 to 1+ in BT patients supports this premise, on the other hand, in BL patients the BI ranged from 2 to 6+ (median 4+), possibly because they showed weaker CMI response to *M. leprae*.

To our best knowledge there are only three studies in which *in situ* iNOS expression was analyzed in borderline patients. In one of them, the researchers evaluated only BT patients and did not find immunostained cells in cutaneous lesions¹³; in the other studies, however, iNOS was present in lesions of BT patients^{15,26}, corroborating our findings. Nonetheless, there are scarce studies *in vitro* aiming at verifying the role of cytokines in the immune response of BT apart from BL patients. In this way, we found the study reported by Misra *et al.*¹¹ who identified Th1 and Th0 profiles in BT patients and Th0 and Th2 in BL patients.

Our results also demonstrated higher TGF- β 1 production in lesions from BL patients; however we did not find significant difference in PBMC supernatants between the BT and BL groups. The *in situ* studies demonstrate different results, i.e., TGF- β 1⁺ cells found only in lesions from BL patients⁽¹⁰⁾ or both BT and BL groups.^{13,14} Thus, in the borderline group it does not seem to have an agreement about the presence of this cytokine in skin lesions. Goulart *et al.*²⁷ studying adhered PBMC cells in cell culture supernatants verified differences in TGF- β 1 production in the polar forms of the disease; nevertheless, in BT and BL patients, these researchers did not find differences in PGL-I-stimulated or not-stimulated cultures. Although in the present study we have used mixed blood cells populations (lymphocytes

and monocytes), our results are showed similar production of TGF- β 1 in the borderline group.

In the borderline group we observed positive correlation between TGF- β 1 and BI and negative correlation between the TGF- β 1 and iNOS tissue expression. This result is in agreement with the immunosuppressive role of TGF- β 1, once this cytokine inhibits IFN- γ expression and the macrophage lytic activity by suppression of ROI and RNI production²⁸. This way, the presence of bacilli in lesions reflects the failure of an effective *M. leprae* CMI response, a characteristic feature of multibacillary patients, especially BL patients.

We also verified the production of IL-10 in lesions of BT and BL patients and high levels of this cytokine in PBMC supernatants in both subgroups. It is possible that, the presence of IL-10 together with TGF- β 1 in lesions of BL patients, favored the maintenance of bacilli in granulomas, once both IL-10 and TGF- β 1 could suppress CMI response to *M. leprae*. In the BT group, the high iNOS and low TGF- β 1 tissue expression, associated with to the presence of IL-10⁺ cells in the periphery of the granuloma and in the connective tissue suggests an immunoregulatory role of IL-10. It should be emphasized that a more precise identification of the cells that are producing these cytokines, T lymphocytes and/or other mononuclear cells, using double staining with anti-IL-10 and anti-CD3 antibodies.

The immunoregulatory role of IL-10 in leprosy was also suggested by other researchers. Stefani *et al.*²⁹, studying paucibacillary patients with single lesions, found positive correlation between the mRNA expression for IL-10 and IFN- γ , IL-10 and IL-12 and between IL-10 and TNF- α . Belone²⁶

reported consistent IL-10 immunostaining in reactional and non-reactional lesions of TT and BT patients, however, only in reactional manifestations there was a significant increase of IL-10⁺ cells, suggesting the activation of Th3 cells in the attempt to deactivating the strong damaging tissue reaction. Thus, these results together with our findings reinforce the role of IL-10 as an immunoregulatory cytokine.

In respect to TNF- α , we did not find any significant difference in PBMC supernatants between BT and BL patients. Considering that TNF- α is a cytokine that acts in synergy with IFN- γ increasing the phagocytes microbicidal capacity and favoring the maintenance of the granulomatous process^{30,31}, it is possible that in BT patients its restricts the infectious process decreasing the bacillary load, in BL patients, however, the presence of high TGF- β 1 and low IFN- γ levels allows bacillary proliferation.

It is reasonable to assume that the results obtained on this study reflect only one moment from the whole evolution process of the disease, and once these patients are immunologically unstable, if they are not treated they tend to evolve to the pole of minor resistance.³² According to this, we can infer that the presence of IFN- γ and iNOS in BT patients points out to a more evident Th1 profile and the presence of high levels of TGF- β 1 in BL patients suggests the participation of suppressor mechanisms. In addition to that, we verified the increased IL-10 levels in BL patients suggesting a Th2 profile. It is also possible to infer the participation of T regulatory cells, such as Th3 lymphocyte and/or Treg cells (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), in the production of IL-10 and TGF- β 1.³³ In granulomatous infectious diseases, such as paracoccidioidomycosis and leishmaniasis, it has been demonstrate

an increased expression and function of Treg cells in lesions.³⁴⁻³⁶ It has been suggested that these cells could contribute with persistence of the parasite and induction of chronicity on the infectious process. It is possible that similar fact happens in the borderline group, especially in BL patients, once numerous bacilli are found in lesions of these patients.

In the present study, PBMC supernatants results were compared with *in situ* by the Spearman correlation coefficient and a positive correlation was verified between iNOS tissue expression and IFN- γ production by PBMC stimulated with *M leprae* antigens. In regards to IL-10, we did not verified correlation between the supernatant and the lesions, however, the *in situ* production of IL-10 was similar to that found in PBMC supernatant, because the statistical analysis did not show any significant difference between BT and BL patients. Considering our results, we suggested that the PBMC culture supernatant is a good parameter for evaluation of the immunological changes that occur in cutaneous lesions and can be used on determination of the immune response profile, especially when *in situ* is not possible.

The results obtained in this study suggest that borderline patients exhibit mixed cytokines profiles, mainly a Th1 profile in BT patients and Th2 in BL patients, with a possible participation of Th3 and/or Treg (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) cells.

Acknowledgements

We thank Dr. Raul Negrão Fleury, Instituto Lauro de Souza Lima, by the histopathological evaluation, Dr. Patrick Brennan and Dr. John Spencer, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, USA for supplying the *M. leprae* antigens used in this study and CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) which has given a Master's scholarship to James Venturini.

Authors' Contributions

James Venturini performed the lab assays and wrote the manuscript. Cleverson Teixeira Soares evaluated the immunohistochemistry and photographed the slides for the manuscript. Andréa de Faria Fernandes Belone participated on the immunohistochemical evaluation. Jaison Antonio Barreto and Somei Ura selected and classified the patients. José Roberto Pereira Lauris statistically analyzed the data. Fátima Regina Vilani Moreno designed the study, supervised data analysis and checked the manuscript. All authors participated on the interpretation of data, read and approved the final manuscript.

Copyright: All authors state that this material has not been published in the present form in any other scientific journal.

Competing interest statement: All authors declare that the answers to the questions on competing interest form are all 'No', and therefore have nothing to declare.

Patient consent form: All subjects who entered this study were enrolled after signing an informed consent form.

Ethical approval: The study was approved by the ethics committee of Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brazil.

Funding: Scholarship - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Brasília, Brazil).

Statement of the independence of researchers from funders: All authors say there are no conflicts of interests to declare.

References

1. Ridley DS, Jopling WH. Classification of leprosy according to immunity: a five groups system. *Int J Lepr* 1966; **34**: 255-273.
2. Naafs B, Silva E, Vilani-Moreno F, Marcos EC, Nogueira ME, Opromolla DVA. Factors influencing the development of leprosy: an overview. *Int J Lepr* 2001; **69**: 26-33.
3. Goulart IM, Penna GO, Cunha G. Immunopathology of leprosy: the complexity of the mechanisms of host immune response to *Mycobacterium leprae*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2002; **35**: 365-375.
4. Yamamura M, Uyemura K, Deans RJ, Weinberg K, Rea TH, Bloom BR *et al.* Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science* 1991; **254**: 277-279.
5. Mutis T, Kraakman EM, Cornelisse YE, Haanen JBAG, Spits H, De Vries RRP *et al.* Analysis of cytokine production by *Mycobacterium*-reactive T cells. Failure to explain *Mycobacterium leprae*-specific non responsiveness of peripheral blood T cells from lepromatous leprosy patients. *J Immunol* 1993; **150**: 4641-4651.
6. Rojas-Espinosa O. Active humoral immunity in the absence of cell-mediated immunity in murine leprosy: lastly an explanation. *Int J Lepr* 1994; **62**: 143-147.
7. Modlin RL. Th1-Th2 paradigm: insights from leprosy. *J Invest Dermatol* 1994; **102**: 828-832.
8. Trao VT, Huong PL, Thuan AT, Anh DD, Trach DD, Rook GA *et al.* Changes in cellular response to mycobacterial antigens and cytokine production patterns in leprosy patients during multiple drug therapy. *Immunology* 1998; **94**: 197-206.
9. Weir RE, Brennan PJ, Butlin CR, Dockrell HM. Use of a whole blood assay to evaluate in vitro T cell responses to new leprosy skin test antigens in leprosy patients and healthy subjects. *Clin Exp Immunol* 1999; **116**: 263-269.
10. Goulart IBM, Figueiredo F, Coimbra T, Foss NT. Detection of transforming growth factor- β 1 in dermal lesions of different clinical forms of leprosy. *Am J Pathol* 1996; **148**: 911-917.
11. Misra N, Murtaza A, Walker B, Narayan NP, Misra RS, Ramesh V *et al.* Cytokine profile of circulating T cells of leprosy patients reflects both indiscriminate and polarized T-helper subsets: T-helper phenotype is stable and uninfluenced by related antigens of *Mycobacterium leprae*. *Immunology* 1995; **86**: 97-103.
12. McClean K, G/Yesus E, Cenini P, Demissie A, Amare G. Phenotype and cytokine expression of intralesional cells in borderline leprosy. *Int J Lepr* 1994; **62**: 380-388.
13. Khanolkar-Young S, Snowden D, Lockwood DNJ. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF- β) in leprosy lesions. *Clin Exp Immunol* 1998; **113**: 438-442.
14. Andersson AK, Chaduvula M, Atkinson SE, Khanolkar-Young S, Jain S, Suneetha L *et al.* Effects of prednisolone treatment on

- cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infect Immun* 2005; **73**: 3725-3733.
15. Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Brit J Dermatol* 2001; **145**: 809-815.
 16. Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; **21**: 77-89.
 17. Vilani-Moreno FR, Belone AF, Soares CT, Opromolla DV. Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrate in Jorge Lobo's disease. *Rev Iberoam Micol* 2005; **22**: 44-49.
 18. Faraco J. Bacilos de Hansen e cortes de parafina: método complementar para pesquisa de bacilos de Hansen em cortes de material incluído em parafina. *Rev. bras. Leprol* 1938; **6**: 177-180.
 19. Fite GL. Staining of acid-fast bacilli in parafin sections. *Am J Pathol* 1938; **14**: 491-507.
 20. Ridley DS. A logarithmic index of bacilli in biopsies. 2. Evaluation. *Int J Lepr* 1967; **35**: 187.
 21. Opromola DVA, Belone AFF, Taborda PRO, Taborda VBA. Correlação clinicopatológica em 40 casos novos de lobomicose. *An Bras Dermatol* 2000; **75**:425-434.
 22. Vilani-Moreno F, Fecchio D, de Mattos MC, Moscardi-Bacchi M, Defaveri J, Franco M. Study of pulmonary experimental paracoccidioidomycosis by analysis of bronchoalveolar lavage cells: resistant vs. susceptible mice. *Mycopathologia* 1998; **141**:79-91.
 23. Norman GR, Streiner DL. Biostatistics - The Base Essentials. St. Louis: Mosby Year Book; 1994.
 24. Lockwood DN, Vinayakumar S, Stanley JN, McAdam KP, Colston MJ. Clinical features and outcome of reversal (type 1) reactions in Hyderabad. *Int J Lepr* 1993; **61**: 8-15.
 25. Little D, Khanolkar-Young S, Coulthart A, Suneetha S, Lockwood DN. Immunohistochemical analysis of cellular infiltrate and gamma interferon, interleukin-12, and inducible nitric oxide synthase expression in leprosy type 1 (reversal) reactions before and during prednisolone treatment. *Infect Immun* 2001; **69**: 3413-3417.
 26. Belone AFF. Hanseníase na faixa tuberculóide: estudo comparativo entre manifestações tórpidas e reacionais através de avaliações de antígenos micobacterianos e de parâmetros representativos de hipersensibilidade mediada por células em biópsias cutâneas. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, 2004.
 27. Goulart IM, Mineo JR, Foss NT. Production of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) by blood monocytes from patients with different clinical forms of leprosy. *Clin Exp Immunol* 2000; **122**: 330-334.
 28. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. The L-arginine – Nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; **43**: 109-142.
 29. Stefani MM, Martelli CM, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Brazilian Leprosy Study Group. In situ type 1 cytokine gene expression and

- mechanisms associated with early leprosy progression. *J Infect Dis* 2003; **188**: 1024-1031.
30. Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol* 2008; **214**: 149-160.
31. Lin PL, Plessner HL, Voitenok NN, Flynn JL. Tumor necrosis factor and tuberculosis. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2007; **12**: 22-25.
32. Ridley DS. Skin biopsy in leprosy. Switzerland: Ciba-Geigy. 2 ed. 1987.
33. Cools N, Ponsaerts P, Van Tendeloo VF, Berneman ZN. Regulatory T cells and human disease. *Clin Dev Immunol* 2007; **2007**: 89195.
34. Mendez S, Reckling SK, Piccirillo CA, Sacks D, Belkaid Y. Role for CD4+CD25+ regulatory T cells in reactivation of persistent leishmaniasis and control of concomitant immunity. *J Exp Med* 2004; **200**: 201-210.
35. Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; **6**: 353-360.
36. Cavassani KA, Campanelli AP, Moreira AP, Vancim JO, Vitali LH, Mamede RC *et al.* Systemic and Local Characterization of Regulatory T Cells in a Chronic Fungal Infection in Humans. *J Immunol* 2006; **177**: 5811-5818.

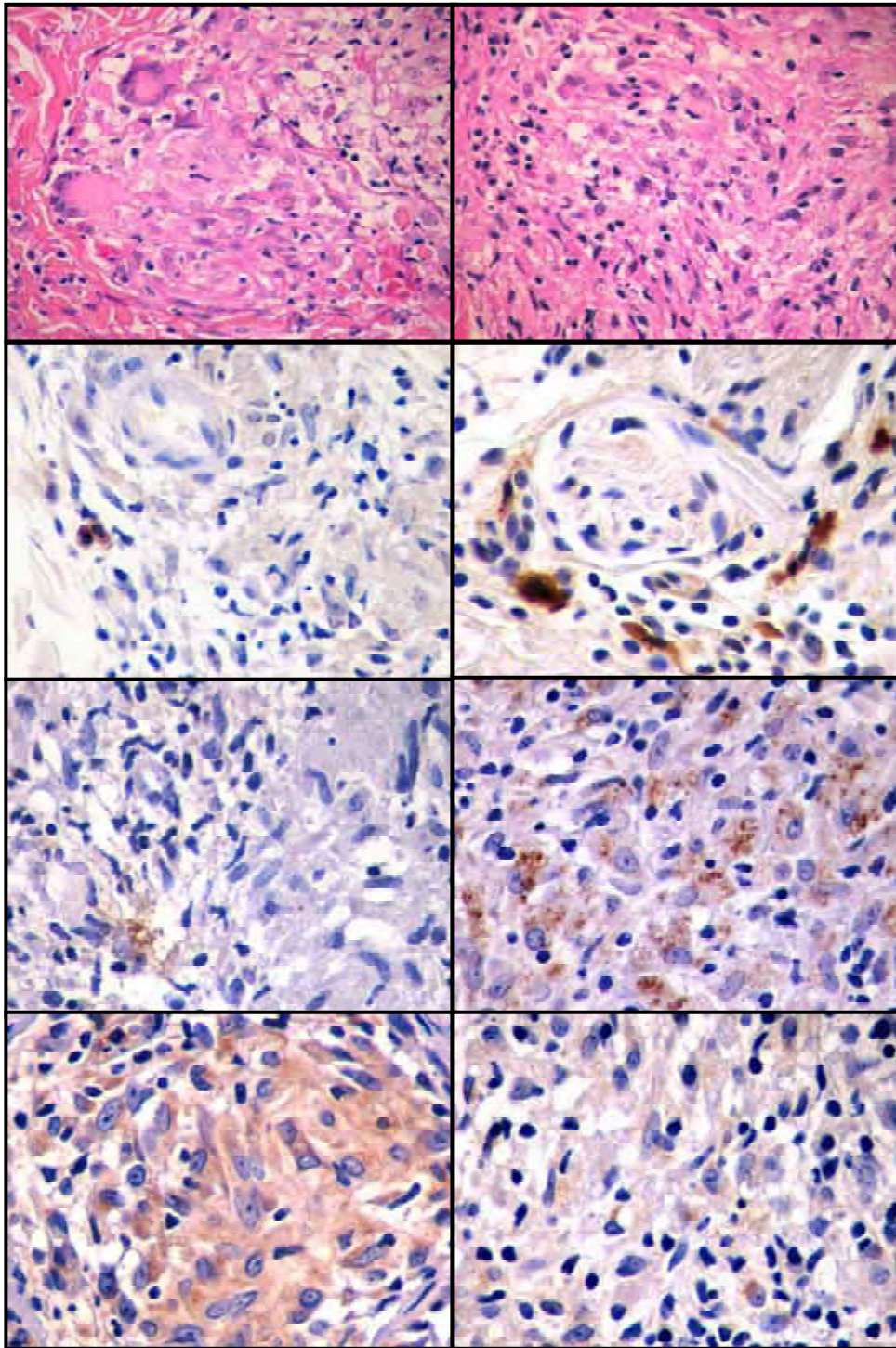


Figure 1. Histological sections of cutaneous lesions obtained from BT and BL patients (objective 40X). **A.** BT patient (HE). Tuberculoid granuloma with multinucleated giant cells and epithelioid cells, permeated with lymphocytes. **B.** BL patient (HE). Loose non-tuberculoid granuloma, composed by non-modified histiocytes interposed by lymphocytes. **C.D.** IL-10 immunolabeling in microscopic sections of BT (**C**) and BL patients (**D**). IL-10⁺ cells at the periphery of granulomas. **E.F.** Immunolabeling of TGF- β 1 in microscopic sections of BT (**E**) and BL patients (**F**). (**E**) Focal expression in histiocytes. (**F**) Diffuse expression in histiocytes cytoplasm. **G.H.** Immunolabeling of iNOS in microscopic sections of BT (**G**) and BL patients (**H**). (**G**) Diffuse cytoplasmatic immunolabeling in histiocytes, epithelioid cells, and multinucleated giant cells. (**H**) Cytoplasmatic immunolabeling in some histiocytes.

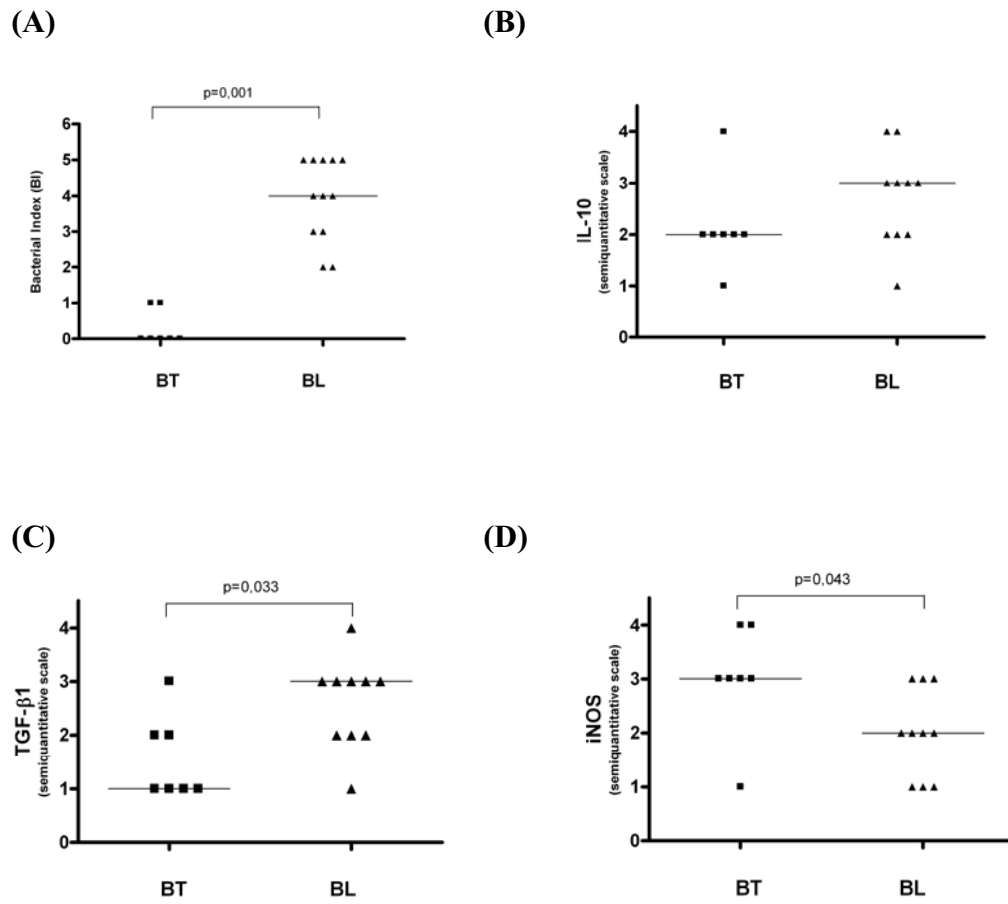


Figure 2. Semiquantitative analysis of bacterial index (BI) (A) and detection of IL-10 (B) TGF-β1 (C) iNOS (D) in BT and BL skin lesions.

Table 1. Quantification of cytokines in the supernatants of peripheral blood mononuclear cells from BT and BL patients. Values are reported as mean $\pm$ standard deviation, in pg/ml.

Stimuli	INF- γ		IL-10		TGF- β 1		TNF- α	
	BT	BL	BT	BL	BT	BL	BT	BL
PHA	1677.1 $\pm$ 1006.1*	1658.2 $\pm$ 866.1*	2494.0 $\pm$ 960.2*	1760.8 $\pm$ 805.8*	1147.5 $\pm$ 287.1*	1447.8 $\pm$ 597.8*	1162.2 $\pm$ 148.2*	1259.3 $\pm$ 232.1*
LPS	9.8 $\pm$ 15.1*	9.1 $\pm$ 19.7*	1829.8 $\pm$ 1184.7*	1898.7 $\pm$ 614.9*	1106.6 $\pm$ 346.5*	1472.7 $\pm$ 688.2*	1079.6 $\pm$ 201.9*	1174.8 $\pm$ 261.1*
WML	10.0 $\pm$ 6.4 $\blacktriangle$	1.1 $\pm$ 1.9 $\blacktriangle$	1150.4 $\pm$ 830.8*	1127.6 $\pm$ 517.3*	1105.6 $\pm$ 321.4*	1365.0 $\pm$ 699.8*	800.3 $\pm$ 297.4*	972.4 $\pm$ 333.2*
MLSON	42.0 $\pm$ 39.8 $\blacktriangle$	9.6 $\pm$ 12.2 $\blacktriangle$	1695.2 $\pm$ 925.1*	1778.9 $\pm$ 692.9*	980.5 $\pm$ 365.2*	1406.8 $\pm$ 614.5*	1005.4 $\pm$ 238.2*	1137.0 $\pm$ 342.2*
CC	8.3 $\pm$ 22.0	3.8 $\pm$ 7.3	929.2 $\pm$ 781.2	419.6 $\pm$ 364.1	700.4 $\pm$ 189.5	875.4 $\pm$ 308.5	383.4 $\pm$ 266.3	284.3 $\pm$ 173.3

PHA: phytohemagglutinin; **LPS:** lipopolysaccharide; **WML:** whole *M leprae* antigen; **MLSON:** *M .leprae* sonicated antigen; **CC:** control cultures (spontaneous release)

* p value <0.05 versus control cultures (CC)

$\blacktriangle$ p value <0.05 between BT and BL