

ISABELA MARIA BERNARDES GOULART

**Detecção de TGF- β 1 em Lesões Cutâneas de
Diferentes Formas Clínicas de Hanseníase**

Universidade Federal de Uberlândia

**Uberlândia - MG
1995**

11/01/95
916.382.21
G624.4
T977.64

ISABELA MARIA BERNARDES GOULART

00200

Detecção de TGF- β 1 em Lesões Cutâneas de Diferentes Formas Clínicas de Hanseníase

Dissertação apresentada ao Colegiado do
Curso de Pós-Graduação em Imunologia
e Parasitologia Aplicadas do Centro de
Ciências Biomédicas da Universidade
Federal de Uberlândia, para obtenção do
título de Mestre.

DIRBI/UFU



1000172260

Orientadora: Prof^a Dr^a Norma Tiraboschi Foss

Co-Orientador: Prof. Dr. Florêncio Figueiredo

**Uberlândia - MG
1995**

Ao meu marido, Luiz Humberto,
companheiro de todas as horas, pela
compreensão, paciência e o amor que me
impulsiona a ir sempre mais além.

Aos meus pais, Luiz Ricardo e Marlene, pelo
testemunho de busca permanente da verdade,
da justiça e do amor.

Aos meus irmãos, Rita Maria, Maria Inês,
Maria Cristina, Luiz Ricardo e Cirino
Alberto, pelo carinho e solidariedade.

“A ciência, por mais pura que seja, é o produto de seres humanos engajados na fascinante aventura de viver suas vidas pessoais” (Frederick Perls).

“A ciência não é um sistema de declarações certas e bem estabelecidas; nem é ela um sistema que avança para um estado final. Nossa ciência não é conhecimento (episteme): ela não pode nunca pretender haver atingido a verdade, nem mesmo um substituto para ela, como a probabilidade” (Karl Popper).

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dra. Norma T. Foss, Departamento de Clínica Médica-FMRP-USP, pelo respeito com que dirigiu sua orientação, permitindo-me caminhar com independência na realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Florêncio Figueiredo, Departamento de Patologia-FMRP-USP, por ter acreditado no projeto e pela competência com que orientou os experimentos necessários para o desenvolvimento do mesmo, realizados no Laboratório de Patologia - FMRP - USP, sob sua chefia.

À Prof^a Dra. Terezila M. Coimbra, Departamento de Fisiologia-FMRP-USP, pelo incentivo à postura ética, pelos anticorpos cedidos e pela orientação na realização dos controles das reações.

Ao Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Departamento de Genética e Bioquímica - CEBIM - UFU, meu irmão, presença científica instigante, pelo apoio concreto em toda a minha carreira.

Ao Prof. Dr. José Roberto Mineo, Diretoria de Pesquisa - Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa - UFU, amigo e principal incentivador da minha opção pela Imunologia, pelas preciosas sugestões na revisão da tese.

Ao Dr. Gerson de Oliveira Penna, Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária - FNS - Ministério da Saúde, amigo e desbravador de caminhos, por ter apostado neste projeto, viabilizando viagens para Ribeirão Preto em 1993.

Ao Prof. Dr. Raul Negrão Fleury, Serviço de Patologia - Instituto Lauro de Souza Lima - Bauru - SP, mestre e amigo, por ter acreditado sempre em minhas possibilidades.

À Dra. Euzenir Nunes Sarno, Serviço de Hanseníase - Fundação Oswaldo Cruz - RJ, pela confiança *à priori* na minha capacidade em desenvolver este trabalho.

Aos amigos da disciplina de Medicina Preventiva - UFU, Melicégenes, Leila, Rosuíta, Carlos Henrique, Neide e Lindioneza, pelo apoio irrestrito em todos os momentos.

À Andréa M. Zangrande (odontóloga) e Marilena Heredia (técnica), Laboratório de Patologia - FMRP-USP, pela colaboração técnica imprescindível.

Aos colegas, Prof. Dr. Ademir Rocha (Departamento de Patologia - UFU), Prof. Alceu Camargo Villela Berbert (Departamento de Clínica Médica - UFU) e à técnica Dagmar do Carmo O. de Sales (Laboratório de Patologia - UFU), pela colaboração no início deste projeto.

Ao Prof. Dr. João José Lachat (Departamento de Morfologia, FMRP-USP) e ao técnico Antônio, pelo empenho no acompanhamento inicial deste projeto.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, Vivian, Marcius, Margareth, Paula, Eduardo e Lindamar, pelo espírito de companherismo e em especial ao Sílvio e Cida, pela total disponibilidade.

Ao João Martins Neto, secretário da Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas - Departamento de Patologia - UFU, pela distinção no relacionamento com as pessoas.

À Diretoria Regional de Saúde de Uberlândia - SES - MG, através da diretora Maria Leonor Cardoso Nogueira e do Dr. Eduardo Sanchez, chefe do Serviço de Epidemiologia, pelo empenho na minha liberação para dedicação plena à este trabalho.

À FAEPU-UFU, pelo apoio financeiro, através de bolsa de estudo, durante o ano de 1993.

À PROPP-UFU, pelo financiamento dos reagentes e lâminas de micrótomo utilizados neste projeto.

À todos os colegas e amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a elaboração deste trabalho, o meu reconhecimento e gratidão.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO.	1
MATERIAL E MÉTODOS	23
Biópsias de Pele	23
Reação de Imunohistoquímica - Método Avidina-Biotina	
Peroxidase (Complexo-ABC)	24
RESULTADOS	28
Aspectos Histopatológicos	28
Achados Imunohistoquímicos	32
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO	39
RESUMO	56
SUMMARY	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58

INDÍCE DE TABELA E FIGURAS

Lista de Tabela

Tabela 1. Imunohistoquímica para TGF-β1 segundo forma
clínica de hanseníase, índice baciloscópico (IB),
teste de Mitsuda (mm) e histopatologia..... 30

Lista de Figuras

Figura 1. Tuberculóide Polar.....34

Figura 2. Borderline-Tuberculóide.....35

Figura 3. Borderline-Borderline.....36

Figura 4. Borderline-Lepromatoso.....37

Figura 5. Lepromatoso Polar.....38

INTRODUÇÃO

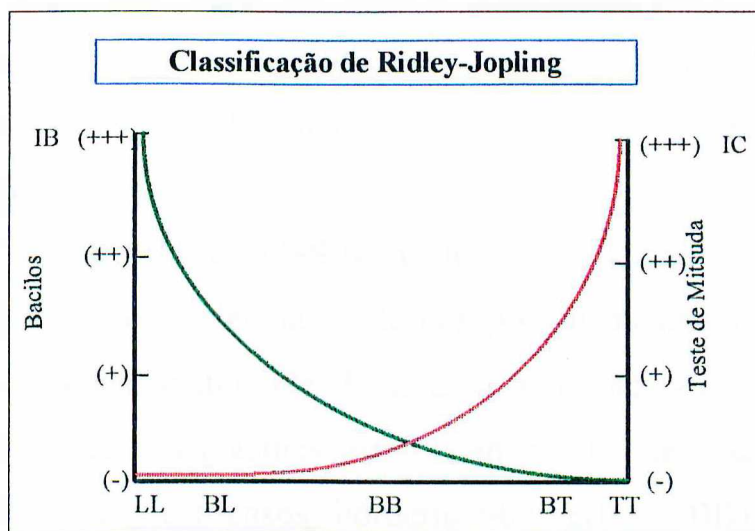
A hanseníase é uma doença instigante não apenas pelas suas considerações humanitárias relacionadas ao estigma, mas também pelo fato da resposta à infecção pelo *Mycobacterium leprae* variar de uma forma completamente livre de bacilo, a doença granulomatosa crônica, a uma forma disseminada sem resposta inflamatória, que tem horrorizado a humanidade desde os tempos bíblicos (Gaylord & Brennan, 1991).

O agente etiológico, *Mycobacterium leprae*, é um parasita intracelular obrigatório principalmente de fagócitos mononucleares e células de Schwann e pode ocorrer nos tecidos em grandes quantidades sem contudo causar sintomas clínicos. A maioria dos sintomas e complicações importantes da doença é devido a reações imunes contra constituintes antigênicos liberados pelos bacilos (Harboe, 1985).

A doença é de amplo espectro clínico e histopatológico. O curso após infecção pelo *Mycobacterium leprae* é altamente variável e depende da capacidade do indivíduo em desenvolver uma resposta imune competente para determinar se a doença se manifestará no pólo tuberculóide ou pólo virchowiano ou no espectro intermediário. Estas diferentes manifestações, clinicamente estabelecidas, estão associadas com diferentes tipos de reatividade imune, mas é pouco conhecido se estas diferenças são de importância primária para o curso após exposição ao *Mycobacterium leprae* ou uma consequência do desenvolvimento da infecção (Harboe, 1985).

Os grupos polares, tuberculóide (TT) e lepromatoso (LL), são clinicamente estáveis e bastante diferentes nas suas características clínicas, histopatológicas e imunológicas. A designação BT, BB e BL é usada para o grupo intermediário do espectro chamado "borderline": borderline-tuberculóide, borderline-borderline e borderline-lepromatoso, respectivamente (Ridley & Jopling, 1966). A forma indeterminada (I) é a manifestação inicial

da doença que ainda não desenvolveu os aspectos diferenciais das formas polarizadas (Esquema 1).



Esquema 1. Adaptado de Pfaltzgraff & Bryceson, 1975.

Na **hanseníase tuberculóide** há o grau máximo da capacidade imunecelular representado pela formação de granuloma tuberculóide, constituído por agregado de células fagocitárias mononucleares com diferenciação epitelióide bem evidente e participação de células gigantes multinucleadas tipo Langhans no centro da lesão e com a presença de linfócitos que confere um halo denso contornando este granuloma (Fleury, 1989). Os pacientes neste pólo da doença apresentam poucas lesões dermatológicas que são bem delimitadas e que tendem à cura espontânea.

A **hanseníase lepromatosa ou virchowiana** é caracterizada por um defeito na imunidade mediada por célula. A lesão histopatológica mostra um extenso infiltrado celular composto de histiócitos-macrófagos carregados com bacilos que contém grandes quantidades de lípideos em sua parede, conferindo o aspecto de células espumosas e às vezes multivacuoladas. A epiderme está achatada e a zona sub-epidérmica não está envolvida. Neste pólo anérgico da doença, ocorrem múltiplas lesões clínicas com acometimento sistêmico, nas quais os bacilos crescem aparentemente sem inibição (Ridley & Jopling, 1966).

O grupo "**borderline**" ou **dimorfo** da hanseníase é altamente complexo. Basicamente é instável e a distinção entre um sub-grupo de maior resistência (BT) para outro de menor resistência (BL) se basearia na indiferenciação progressiva da célula macrofágica, diminuição do número de linfócitos e no aumento do número de bacilos nos granulomas e ramos nervosos (Fleury, 1989).

Segundo Ridley (1990), na forma **borderline-tuberculóide** (BT), relativamente de alta resistência, as lesões podem mostrar raros bacilos e o granuloma é de células epitelióides focalizadas por zona periférica de linfócitos com presença de células gigantes tipo Langhans algumas vezes numerosas e tipo corpo estranho. Os casos **borderline-borderline** (BB) são poucos e clinicamente tendem a se mover para um dos pólos. O número de bacilos é maior, com células epitelióides difusamente espalhadas por todo o granuloma e não focalizadas por zonas de linfócitos. Células gigantes e linfócitos em geral são escassos e difusos. Há presença de edema intra e intercelular o qual é um aspecto comum do BB associado à sua tendência à reação. Os **borderline-lepromatosos** (BL) apresentam granuloma composto de macrófagos indiferenciados que contém grande número de bacilos. Este granuloma é diferenciado daquele do LL por áreas de densa infiltração linfocitária.

Sobre esse espectro impõe-se ainda os chamados "estados reacionais" de reação reversa e *eritema nodosum leprosum* (ENL). As reações reversas, que ocorrem principalmente nos dimorfos, são consideradas reações de hipersensibilidade do tipo tardio contra antígenos do *Mycobacterium leprae*, por causa da marcante resposta linfocitária aos antígenos do bacilo e a frequente ascensão no "status" clínico e padrão histológico dos pacientes em direção ao pólo tuberculóide (Waters et al., 1971; Godal et al., 1973; Barnetson et al., 1976; Modlin et al., 1983b; Narayanan et al., 1984a).

O ENL é uma síndrome freqüentemente observada nos doentes virchowianos, cuja patogênese é aquela da deposição de imunocomplexos constituídos por fragmentos antigênicos do bacilo e depósitos granulares de imunoglobulinas (principalmente IgG e IgM) e complemento, em uma

distribuição perivascular no infiltrado de células polimorfonucleares nas lesões (Wemambu et al., 1969; Drutz et al., 1973; Bjorvatn et al., 1976), como também imunocomplexos circulantes (Moran et al., 1972; Rojas-Espinosa et al., 1972) com níveis aumentados de IgG, IgM, C2 e C3. Há algumas evidências de envolvimento da célula T (Stach et al., 1982; Modlin et al., 1983b; Narayanan et al., 1984a; Modlin et al., 1986b). Estes pacientes permanecem sem resposta aos antígenos do *Mycobacterium leprae* e são incapazes de eliminar bacilos dos tecidos.

Vários mecanismos têm sido propostos para justificar esta deficiência específica na forma virchowiana. Embora a maioria dos estudos imunológicos na hanseníase tenham sido executados em linfócitos do sangue periférico, Sieling & Modlin (1992) referem que "o ponto focal da resposta imune ao *Mycobacterium leprae* é o granuloma no tecido, uma coleção de linfócitos e macrófagos", que tem sido o ponto central de suas investigações. Este infiltrado de células nas lesões cutâneas de hanseníase, correspondem a 53% de células T nas lesões tuberculóides e 40% nas lesões virchowianas, sendo o restante, macrófagos (Modlin et al., 1983b).

As células T com fenótipo CD4+, conhecidas como T-indutoras ou T-auxiliares, quando ativadas por antígenos que são expressos no contexto das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal - classe II (MHC-II), liberam citocinas tipo interleucina-2 (IL-2) e interferon-gama (IFN- γ), fundamentais para proliferação de linfócitos e ativação de macrófagos respectivamente, induzindo uma resposta imune celular competente. Estas células T antígeno-específicas, produtoras de IL-2, estão presentes em número dez (10) vezes maior em lesões tuberculóides do que em lesões lepromatosas (Modlin et al., 1984). Em lesões tuberculóides, Modlin & Rea (1987) demonstraram, também, que a taxa de linfócitos T4:T8 ("helper/indutor:supressor/citotóxico") é 2:1 enquanto que a taxa em lesões virchowianas é 0,5:1. As taxas no sangue periférico destes pacientes são normais (aproximadamente 2:1) sugerindo que há alguma migração seletiva de células para dentro das lesões ou há uma proliferação local ou mesmo retenção

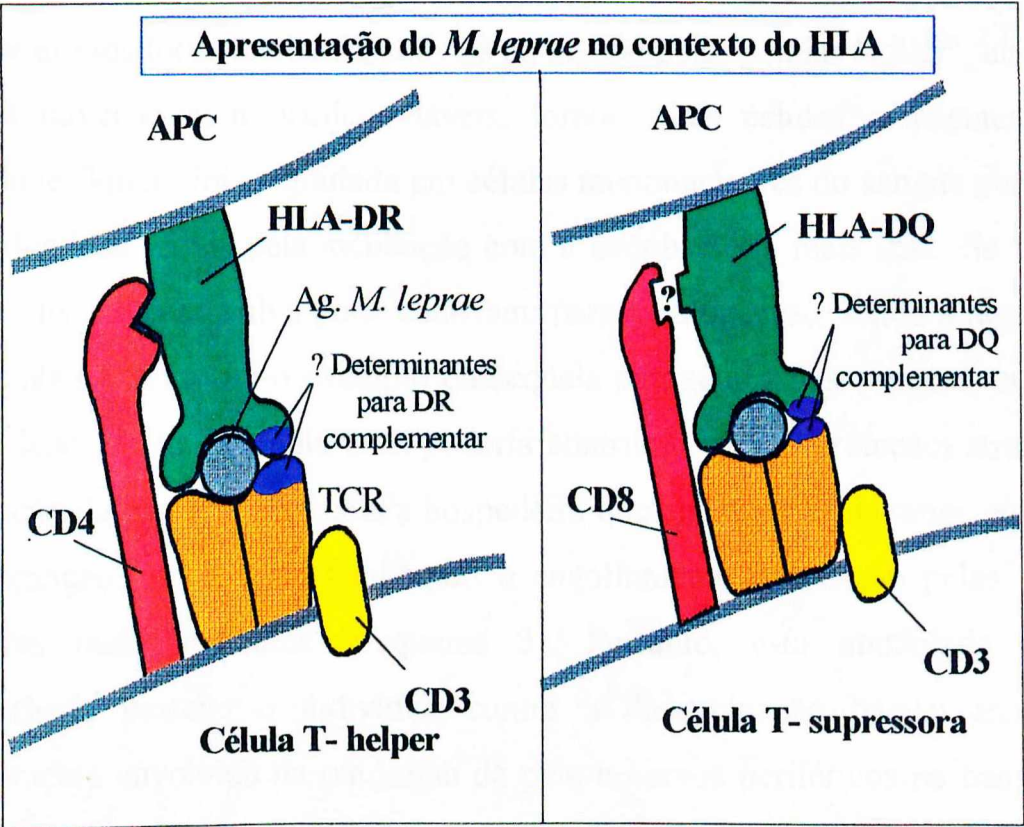
nestas lesões. As células TCD4⁺ estão intimamente apostas aos macrófagos nas lesões tuberculóides, com células TCD8⁺ formando um halo em torno do granuloma (Van Voorhis et al., 1982; Modlin et al., 1983a, 1983b, 1983c; Narayanan et al., 1983). Esta íntima mistura entre macrófagos epitelióides e células T "helper" no centro e a segregação de TCD8⁺ na periferia do granuloma, pode refletir uma ativa cooperação destes tipos de células para promover uma efetiva resposta imune associada à diferenciação epitelióide de células fagocíticas mononucleares, eliminação bacteriana e uma reação de hipersensibilidade do tipo tardio (Modlin et al., 1983c). Nas lesões virchowianas não há separação de subclasses de células T. Ambas células T, CD4⁺ e CD8⁺ estão misturadas com macrófagos, o que pode refletir a falta de uma resposta imune organizada.

Estudos *in vitro* demonstram que células TCD4⁺ de pacientes tuberculóides, diferentemente das obtidas dos pacientes lepromatosos, apresentam resposta ao bacilo (Modlin et al., 1987), enquanto as células TCD8⁺ de pacientes lepromatosos têm atividade supressora antígeno-específica (Mehra et al., 1982; Bloom & Mehra, 1984; Modlin et al., 1986a e 1986c; Bloom et al., 1992) e mostram suprimir esta resposta de células TCD4⁺ por meio da liberação de IL-4 (Salgame et al., 1991a).

Modlin et al. (1988) analisaram outras subclasses de células TCD4⁺ e mostraram que a taxa de T memória:T "naive" é 1:1 no sangue, mas nas lesões tuberculóides é 14:1. Em contraste, nas lesões virchowianas, metade das células CD4⁺ pertencem à subclasse "naive" de células T. Isto significa um padrão de células T que não foram ativadas, neste pólo anérgico da hanseníase. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que a maioria das células TCD8⁺ que infiltram as lesões virchowianas é CD28⁻, indicando que estas são células T supressoras, enquanto que células CD8⁺ de fenótipo T-citotóxico (CD28⁺) predominam nas lesões tuberculóides.

A resistência adquirida à infecção com parasitas intracelulares como as micobactérias é dependente de um processo de reconhecimento dual em que o antígeno é apresentado ao receptor de linfócitos T (TcR) pelas

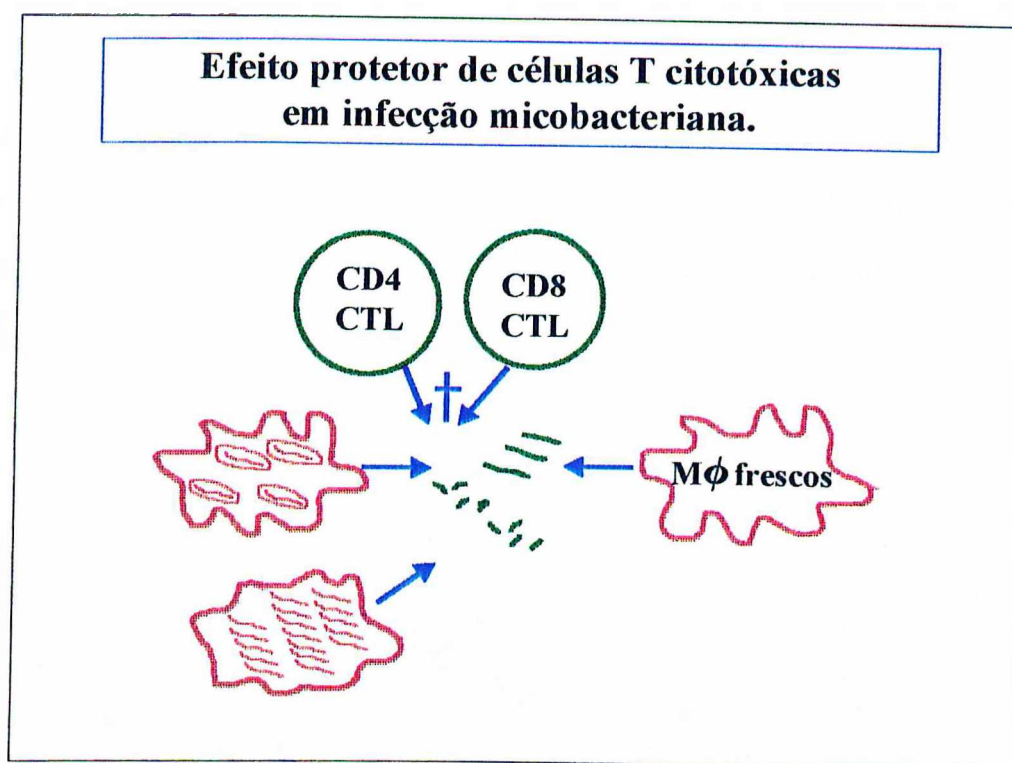
células apresentadoras de antígenos (APC) tais como macrófagos, no contexto das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Para as células CD4+, a molécula de histocompatibilidade é da classe II, requerimento obrigatório na hanseníase tuberculóide onde clones de células CD4+ proliferam em resposta ao *M. leprae* apenas se os antígenos HLA (antígenos leucocitários de histocompatibilidade) de fenótipo HLA-DR forem complementares entre célula T e APC (Modlin & Bloom,1993; Britton, 1993). A forma tuberculóide está associada a um padrão de antígenos HLA de fenótipo HLA-DR2 e HLA-DR3 que predominam nestes pacientes, sem contudo conferir susceptibilidade à doença (De Vries, 1991). Por outro lado, clones de células TCD8+ supressoras de pacientes lepromatosos suprimem células TCD4+ de pacientes tuberculóides somente se as células TCD8+ forem ativadas por APCs que expressam antígenos HLA-DQ complementares (Salgame et al., 1991b). O fenótipo HLA-DQ1 tem sido associado à susceptibilidade para as formas borderline-lepromatosa e lepromatosa (De Vries, 1991) (Esquema 2).



Esquema 2. Reproduzido de Modlin & Bloom, 1993.

O *Mycobacterium leprae* induz não apenas células T "helper" CD4+ restritas ao MHC-II, mas também é capaz de induzir células T citotóxicas antígeno-específicas de fenótipo CD4+ e CD8+ restritas ao MHC-I, bem como células natural "killer" (NK) não específicas e não restritas pelo MHC, de pacientes com hanseníase e de indivíduos vacinados com BCG, contra macrófagos autólogos que apresentam *M. leprae* ou antígenos micobacterianos relacionados (Kaleab et al., 1990a e 1990b; Steinhoff et al., 1988; Sasiain et al., 1992). Pacientes multibacilares desenvolveram mais baixa atividade citotóxica do que pacientes paucibacilares e os controles normais. Na hanseníase virchowiana também foi demonstrado defeito na geração de células T citotóxicas no ensaio de linfólise mediada por célula (CML) contra células alogeneicas (Stach et al., 1982).

A baixa resposta citotóxica de linfócitos de pacientes virchowianos contra monócitos do sangue periférico ativados por antígenos micobacterianos, sugere que a atividade citotóxica estaria relacionada à presença do agente etiológico. Steinhoff et al. (1991) mostraram *in vitro* que células de Schwann e fagócitos mononucleares infectados com *Mycobacterium leprae* mortos tornaram-se suscetíveis ao ataque pelas células "killer", enquanto que a infecção com bacilos viáveis, tornou estas células resistentes. Esta atividade "killer" foi estimulada em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios pela incubação com a micobactéria mais IL-2. Se por um lado, a lise da célula alvo pode contribuir para a patogênese, sendo a destruição da célula de Schwann o exemplo da seqüela patogênica deste mecanismo, por outro lado, a lise da célula alvo poderia contribuir para a proteção, através da liberação da bactéria pela célula hospedeira que encontra-se incompetente para a destruição intracelular, facilitando o engolfamento bacteriano pelas células efetoras mais eficientes (Esquema 3). Portanto, esta imunidade celular exacerbada protege o indivíduo contra a disseminação bacilar mas está diretamente envolvida na patologia da pele e nervos periféricos na hanseníase tuberculóide (Ottenhoff, 1994). Este mecanismo parece ausente na forma virchowiana que cursa com alta carga bacilar e lesões disseminadas.

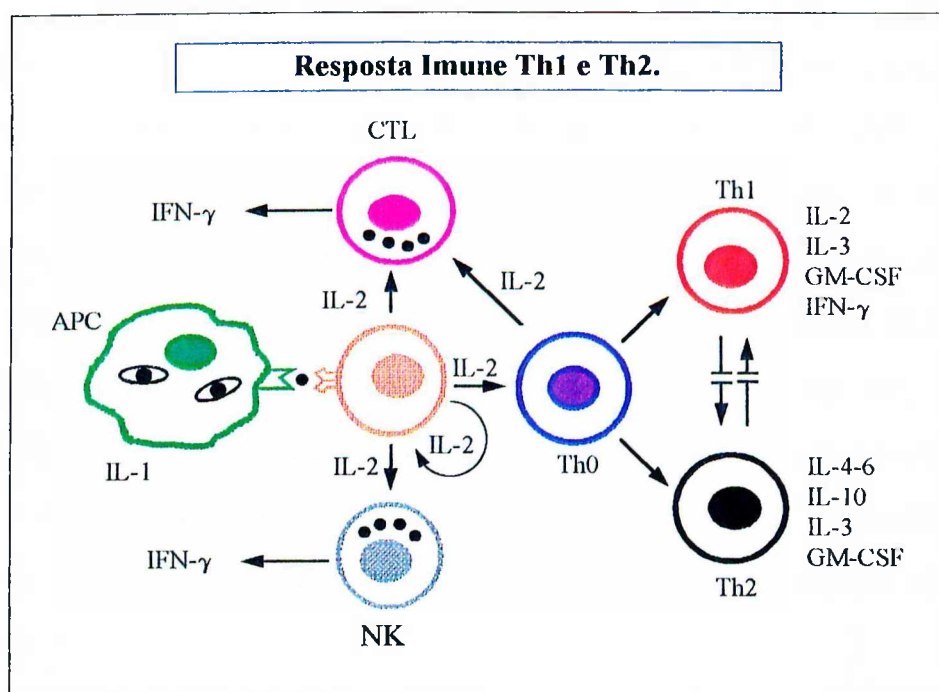


Esquema 3. Adaptado de Ottenhoff, 1994.

Em algumas doenças micobacterianas, como a tuberculose, a resistência depende crucialmente da ativação de macrófagos mediada por célula T antígeno-específica, que secretam linfocinas efetoras tipo IFN- γ estimulando a atividade microbida dos macrófagos que inibem a proliferação das micobactérias no seu interior (Chan et al., 1992). Uma relação inversa entre proliferação de células T antígeno-específicas e níveis de anticorpos é vista em pacientes portadores de tuberculose com resistência defectiva (Surcel et al., 1994) e é também encontrada em pacientes com hanseníase virchowiana (Harboe, 1985; Sieling & Modlin, 1992).

O perfil de citocinas secretadas *in vitro* é visto como um indicativo da relação entre função de linfócitos e especificidade antigênica (Surcel et al., 1994). Células TCD4⁺ de camundongos têm sido divididas em, no mínimo, duas diferentes subclasses (Th1 e Th2), baseadas no perfil de citocinas que elas secretam após estimulação antigênica (Mosmann et al., 1986). Células Th1 caracteristicamente secretam interleucina-2 (IL-2) e interferon- γ (IFN- γ), mediadores da reação de hipersensibilidade do tipo tardio (Cher & Mosmann, 1987), enquanto linfócitos Th2 produzem tipicamente IL-4, IL-5 e IL-10, as

quais aumentam a síntese de anticorpos por células B (Stevens et al., 1988) e têm um papel em doenças alérgicas (Corrigan & Kay, 1992). Células TCD4+ com um perfil de citocinas intermediárias (Th0) têm sido descritas (Street et al., 1990). As citocinas secretadas pelos tipos de células Th1 e Th2 podem mutuamente regular e inibir as funções uma da outra (Mosmann & Moore, 1991) (Esquema 4).

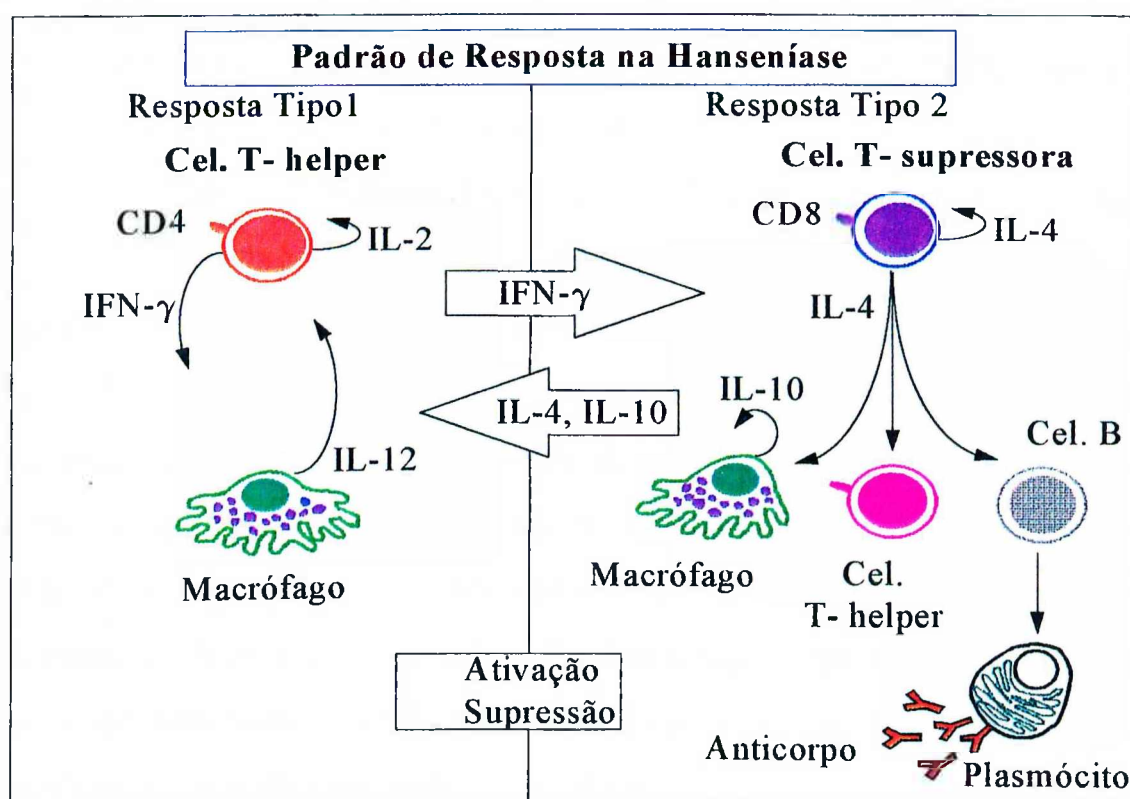


Esquema 4. Adaptado de Britton, 1993.

O espectro de resposta do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae* fornece um modelo para investigar o papel das citocinas na patogênese da doença micobacteriana. Há uma correlação das formas clínicas da doença com a presença de citocinas tais como IL-2 (Modlin et al., 1984; Longley et al., 1985; Flad et al., 1990; Scollard, 1991; Yamamura et al., 1991), IFN-γ (Yamamura et al., 1991; Volc-Platzer et al., 1988; Arnoldi et al., 1990; Flad et al., 1990; Scollard, 1991) nas lesões tuberculóides e IL-4, IL-5 e IL-10 nas lesões lepromatosas (Yamamura et al., 1991). Portanto, RNAs mensageiros de linfocinas que se assemelham àsquelas das células Th1 de murinos, correlacionada à imunidade mediada por células a uma variedade de patógenos, predominaram em lesões tuberculóides; estas lesões são de resolução

predominaram em lesões tuberculóides; estas lesões são de resolução espontânea e caracterizadas por resistência ao crescimento do *Mycobacterium leprae*. Ao contrário, RNAs mensageiros de linfocinas que se assemelham às das células murinas Th2, que estão associadas com vários modelos experimentais de infecção progressiva (Heinzel et al., 1989; Mosmann et al., 1986), predominaram nas lesões virchowianas (Rojas-Espinosa, 1994).

A correlação das formas clínicas com a presença de citocinas específicas, associa-se ainda com a ativação de fagócitos mononucleares que na forma tuberculóide secretam IL-1 β , TNF- α (Arnoldi et al., 1990; Flad et al., 1990; Silva & Foss, 1989; Barnes et al., 1992), citocinas com atividade inflamatória envolvidas na formação do granuloma, e IL-12 (Sieling et al., 1994), mediador importante na geração da resposta de citocinas Th1 presentes nesta forma clínica (Yamamura et al., 1991). Em contraste, na forma lepromatosa os macrófagos secretam principalmente IL-10 (Sieling et al., 1993), citocina desativadora de macrófagos e supressora da proliferação de células do tipo Th1 que estão ausentes nesta lesão LL (Yamamura et al., 1991) (Esquema 5).

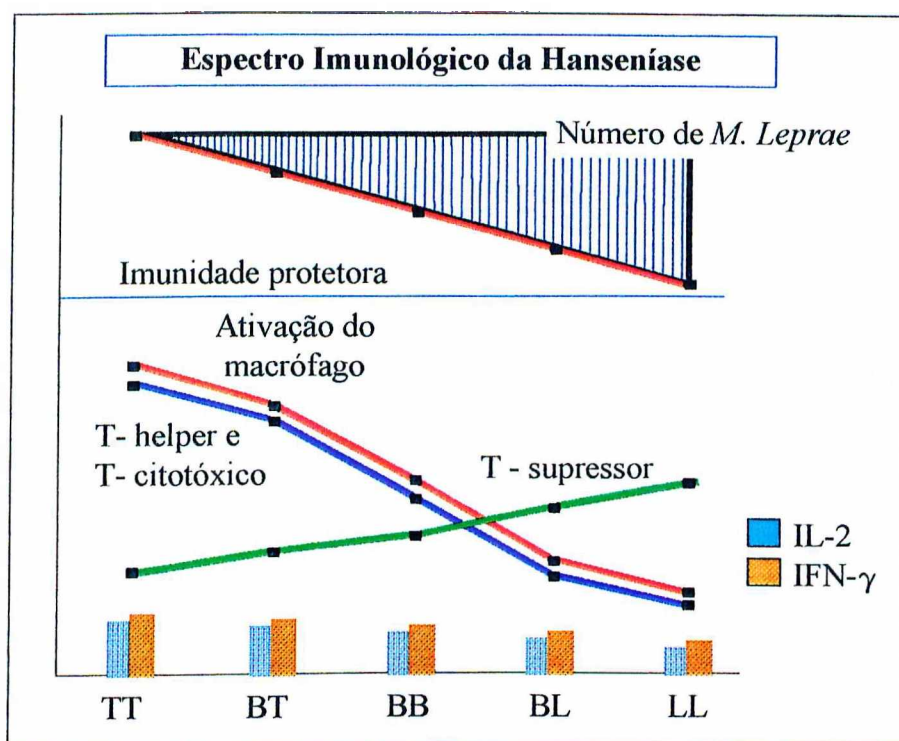


Esquema 5. Reproduzido de Modlin & Bloom, 1993.

No teste de linfoproliferação *in vitro* pela concanavalina A (ConA), a adição de sobrenadante de macrófagos de virchowianos estimulados pela lepromina, provoca supressão da resposta mitogênica (Mehra et al., 1979; Nath et al., 1980; Salgame et al., 1983), demonstrando a presença de fatores supressores liberados pelos macrófagos infectados pelo *M. leprae*. Os macrófagos virchowianos podem ter defeito na expressão de marcadores de superfície da célula (Birdi et al., 1983; Mistry et al., 1985) e na liberação de interleucina-1, citocina ativadora de célula T, após estimulação antigênica (Watson et al., 1984; Ridell et al., 1986). Macrófago com função defectiva poderia levar à deleção de clones de células T "helper" ou indução de células T supressoras (Modlin e Rea, 1987).

De acordo com Sieling & Modlin (1992), as células de Langerhans, macrófagos intraepidérmicos com uma morfologia dendrítica, têm a capacidade de apresentar antígenos e estão em maior número nas lesões tuberculóides do que nas lesões lepromatosas (Modlin et al., 1983a; Rea et al., 1986). Estas células foram identificadas por anticorpo monoclonal (mAb) OKT6 (Narayanan et al., 1984b). Além do mais, compartilham o epitopo CD1⁺ com timócitos imaturos, localizando-se na periferia do granuloma tuberculóide e são infrequentes no granuloma virchowiano (Collings et al., 1985; Kaplan et al., 1987; Modlin et al., 1984; Longley et al., 1985).

Fagócitos mononucleares são indispensáveis para a imunidade natural e adquirida do hospedeiro. *M. leprae* é um patógeno intracelular obrigatório que é ingerido por monócitos/macrófagos e proliferam dentro destas células. Na hanseníase tuberculóide ocorre ativação macrofágica na presença de grande quantidade de IFN- γ produzido por células T-citotóxicas (CTL), natural "killer" (NK) e "killer" ativadas por linfocinas (LAK), induzidas a proliferar na presença de IL-2, levando à eliminação bacilar (Esquema 6). Na hanseníase virchowiana, a inabilidade dos macrófagos para matar o bacilo é um aspecto predominante desta forma clínica e consequentemente os macrófagos nesses pacientes estão carregados de *M. leprae*.

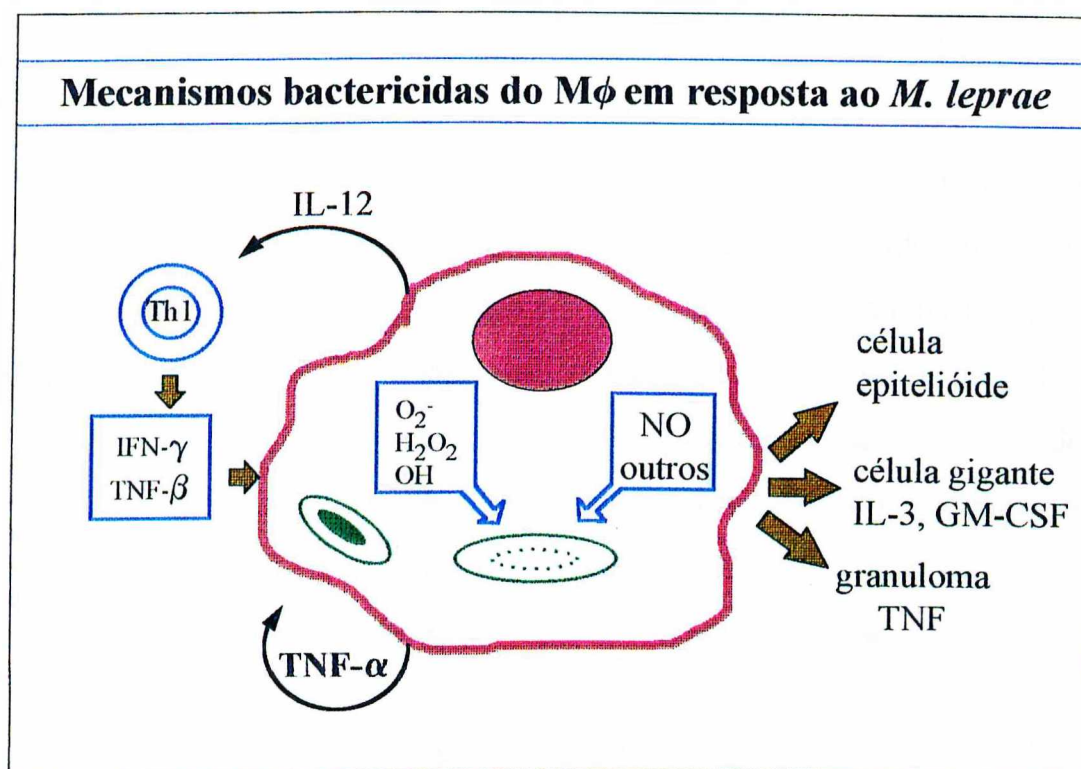


Esquema 6. Reproduzido de Scollard, 1991.

Em modelo experimental com camundongos Swiss infectados com *M. leprae*, os macrófagos peritoneais apresentaram uma inibição do "burst" respiratório e consequente falha na produção de reativos intermediários do oxigênio (ROI) que são tóxicos para o microorganismo (Kohli et al., 1992). O PGL-1 (glicolípido fenólico-1), antígeno específico do *M. leprae*, um abundante glicolípido de superfície o qual é detectável nos tecidos e soro de pacientes virchowianos, causa uma inibição específica da liberação de citocinas por monócitos de indivíduos sadios após estimulação pelo LPS *in vitro* (Silva et al., 1993) e também suprime a resposta oxidativa de monócitos pré-tratados com este antígeno (Neill & Klebanoff, 1988; Vachula et al., 1989 e 1990). O PGL-1 também é capaz de induzir supressão de resposta mitogênica *in vitro* de linfócitos de pacientes com hanseníase (Mehra et al., 1984; Prasad et al., 1987). A presença de grande quantidade de PGL-1, parece ser um fator inibidor da resposta imune celular vista em pacientes virchowianos.

Células fagocíticas respondem à uma variedade de estimulantes de membrana para produção e liberação intra e extracelular de metabólitos intermediários reativos do oxigênio (ROI), que estão relacionados com a

destruição intracelular de patógenos invasores (Nathan et al., 1979; Murray et al., 1979). No ensaio de ativação de macrófagos com "tuftsin" ($\text{NH}_2\text{-Thr-Lys-Pro-Arg-OH}$), estimulador potente da produção de ROI por estas células, os macrófagos de pacientes tuberculóides apresentaram resposta normal, enquanto os macrófagos de pacientes lepromatosos e borderline-lepromatosos não apresentam resposta microbicida à este estímulo (Iyer et al., 1990a e 1990b; Khare et al., 1993) (Esquema 7).

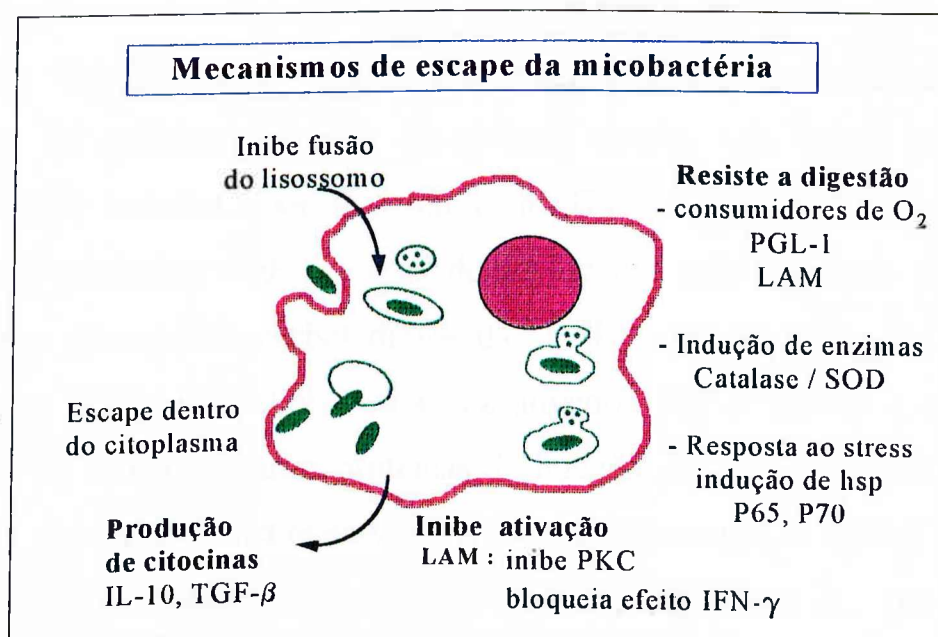


Esquema 7. Adaptado de Britton, 1993.

A ativação do macrófago por linfocinas, particularmente pelo IFN- γ , aumenta a produção desses radicais derivados do oxigênio *in vitro* e *in vivo* (Murray et al., 1985; Nathan et al., 1983 e 1986; Denis, 1991; Sivasai et al., 1993). Na hanseníase virchowiana parece haver uma produção diminuída de IFN- γ , quando linfócitos do sangue periférico foram estimulados com *M. leprae* (Horwitz et al., 1984; Nogueira et al., 1983) e também pela ausência nessas lesões, de células expressando receptor de IL-2 (IL-2R) e antígenos HLA-DR que são marcadores de ativação, demonstrando depressão da atividade do IFN- γ intra-lesional (Volc-Platzer et al., 1988). Além disso, tem sido mostrado que

monócitos de pacientes virchowianos têm reduzida liberação de ROI antes e após a fagocitose *in vitro* do *M. leprae* (Holzer et al., 1986; Launois et al., 1989). Em modelos experimentais, foi observado que macrófagos de granulomas carregados com *M. leprae*, foram incapazes de produzir ânion superóxido (O_2^-) e foram resistentes à ativação pelo IFN- γ (Sibley & Krahenbuhl, 1987; Sibley et al., 1988). Inibição da produção de O_2^- também foi reportada em estudos com macrófagos e monócitos derivados do sangue periférico cultivados *in vitro*, pré-tratados com produtos do *M. leprae* tais como glicolípido fenólico - PGL-1 e lipoarabinomanana - LAM (Neill & Klebanoff, 1988; Vachula et al., 1989 e 1990).

O efeito dessa rede supressora é a persistência do *Mycobacterium leprae* com seus mecanismos de escape intracelular resultando na estimulação crônica defectiva do sistema imune em pacientes virchowianos (Esquema 8). Fatores imunossupressores endógenos têm um importante papel na patogênese de doenças com ativação crônica do sistema imune, como algumas doenças infecciosas e autoimunes. O TGF- β (fator transformador do crescimento-beta) está entre os mais potentes inibidores endógenos de ativação de macrófagos (Tsunawaki et al., 1988; Ding et al., 1990; Bogdan & Nathan, 1993).



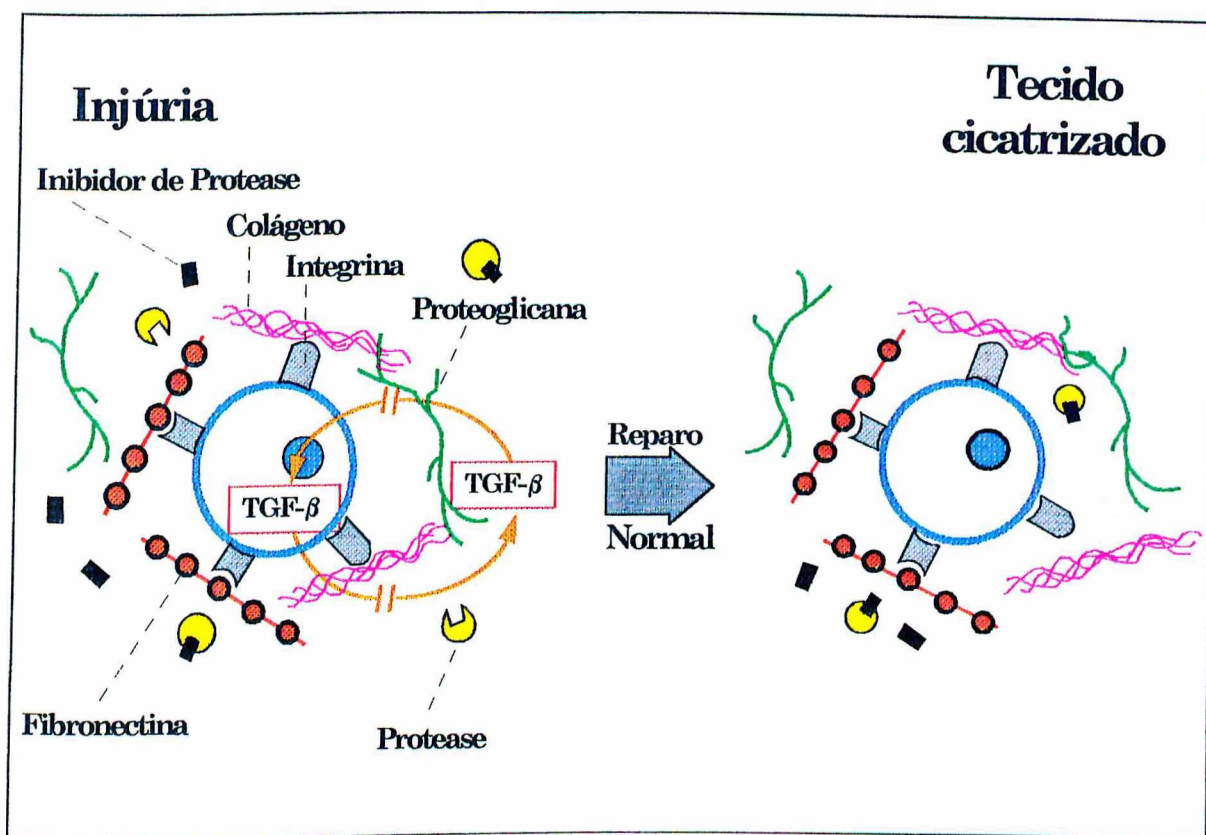
Esquema 8. Adaptado de Britton, 1993.

O TGF- β foi originalmente purificado de plaquetas e placenta humanas e rim bovino (Sporn et al., 1987). No mínimo cinco polipeptídeos homodiméricos que compartilham 70-80% de homologia e muitas atividades biológicas estão representados na família TGF- β . Dessas múltiplas formas, apenas TGF- β 1, - β 2, e - β 3 têm sido identificadas em espécies de mamíferos. O gene para cada uma das isoformas está localizado em diferentes cromossomos e a expressão diferencial pode ocorrer por meio de distintos mecanismos regulatórios específicos da célula (Wahl, 1992). Os peptídeos são codificados como pré-proteínas de 390-412 aminoácidos com sequência sinal de 20-23 aminoácidos na porção amino-terminal (NH_2) (Derynck et al., 1985). TGF- β 1, - β 2 e - β 3 têm um sítio processador de 4-5 aminoácidos, sequência sinal para a peptidase, que, após clivagem proteolítica, são processados para monômeros de 112-aminoácidos (12.5-kDa), os quais têm em comum resíduos de nove cisteínas e a sequência carboxi-terminal, Cys-Lys-Cys-Ser-COOH (Derynck et al., 1985). O homodímero maduro processado de TGF- β (25-kDa) é biologicamente inativo ou latente devido à sua ligação não covalente com a proteína glicosilada associada à latência de 75-kDa (LAP-"glycosylated latency-associated protein"), que está ligada covalentemente a uma terceira proteína de 135-kDa, formando um complexo de aproximadamente 235kDa (Miyazono et al., 1988; Wakefield et al., 1988). A ativação do TGF- β , provavelmente, é um processo de múltiplos passos, envolvendo células tais como macrófagos inflamatórios tratados com IL-1 ou com IFN- γ (Wahl, 1992), que geram sialidases, proteases e glicosidases dentro de um microambiente ácido para remover a estrutura de carboidratos da "LAP" e ativar o complexo latente (Miyazono & Heldin, 1989). Uma vez ativado, TGF- β liga-se à receptores celulares ou a uma ou várias proteínas de ligação. Embora a forma latente da molécula circula com uma meia-vida maior que 90 minutos, o TGF- β ativo tem um clearance da circulação dentro de minutos (Wakefield et al., 1990). Desta forma, a latência confere estabilidade, especificidade de célula-alvo e um meio para o controle extracelular do amplo espectro de atividades dessa influente molécula.

Este polipeptídeo é um regulador "multifuncional" da atividade celular, podendo estimular o crescimento e a diferenciação celular, exibindo diversos papéis regulatórios do sistema imune na resposta do hospedeiro frente à injúria (Sporn e Roberts, 1992). Os três produtos gênicos reagem com receptores tipo I, II e III de alta afinidade na superfície das células e são expressos em número muito variado por muitos tipos de células. O TGF- β é produzido por vários tipos de células incluindo células T e B, macrófagos, plaquetas, células da placenta, ossos e rins (Roberts & Sporn, 1988).

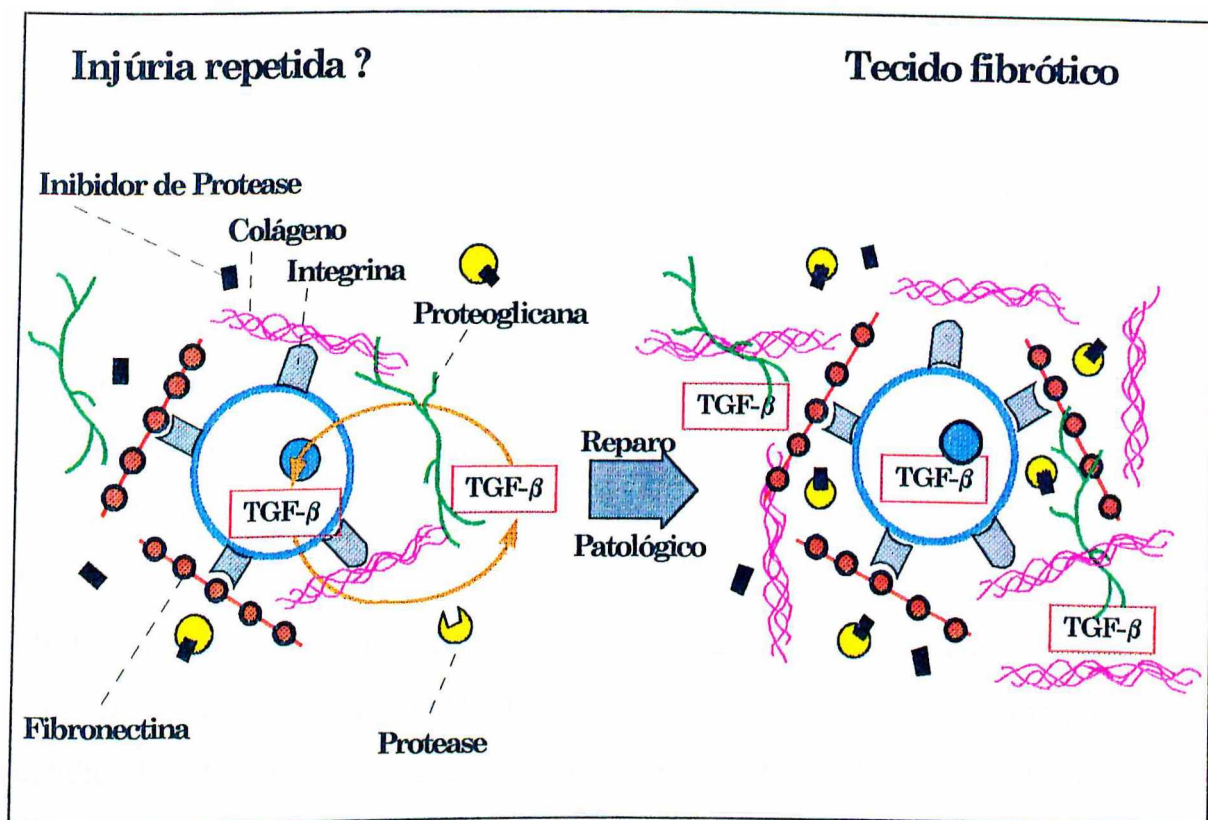
O TGF- β influencia o crescimento de fibroblastos e promove cicatrização de feridas, pela indução da síntese de proteínas da matriz extracelular tais como colágeno, fibronectina e proteoglicanas, e também pela indução de receptores celulares para estas proteínas (Roberts et al., 1992) (Esquema 9). *In vivo*, este polipeptídeo causa o crescimento de novos vasos sanguíneos, um processo chamado angiogênese (Roberts et al., 1986). Tem considerável atividade antiproliferativa para vários tipos de células (ex. células epiteliais, etc) e pode atuar como supressor da imunidade e hematopoiese. Portanto, as ações do TGF- β são pleiotrópicas inibindo o crescimento de muitos tipos de células e estimulando o crescimento de outras (Roberts & Sporn, 1988).

Como é uma potente molécula pró-inflamatória (Noble et al., 1993) e imunossupressora (Bogdan et al., 1992), o TGF- β orchestra eventos vitais para a iniciação, progressão e resolução da resposta inflamatória imune-mediada. Estes efeitos opostos são, provavelmente, controlados por produção e latência seletiva desta citocina, bem como modulação de receptores e susceptibilidade diferencial de células-alvo em vários estágios de desenvolvimento, maturação e ativação (Wahl, 1992).



Esquema 9. Reproduzido de Border & Noble, 1994.

O estímulo à produção de componentes da matriz extracelular por vários tipos de células pelo TGF- β (Sporn et al., 1987; Roberts et al., 1986), inclui a produção de proteoglicanas (Bassols e Massagué, 1988; Border et al., 1990b) que têm sido usadas como marcadores da atividade do TGF- β 1 em vários estudos de doenças glomerulares (Border et al., 1990a; Border et al., 1992). Por causa desta atividade, têm-se evidenciado que o TGF- β 1 tem um papel na regulação normal do processo de cicatrização de feridas (Rappolee et al., 1988; Schmid et al., 1993). Uma desregulação na produção, latência e/ou ativação do TGF- β pode resultar em excessiva síntese de matriz extracelular, que tem sido associada à fibrose (Border & Noble, 1994; Sharma & Ziyadeh, 1994) resultante de vários processos em doenças crônicas (Czaja et al., 1989; Kulozik et al., 1990; Broekelmann et al., 1991; Gabrielli et al., 1993; Sfikakis et al., 1993), onde há esse estímulo à síntese de componentes da matriz extracelular (Isaka et al., 1993; Coimbra et al., 1991) (Esquema 10).



Esquema 10. Reproduzido de Border & Noble, 1994.

Com relação ao sistema imune, o TGF- β é potencialmente importante porque ele antagoniza muitas respostas dos linfócitos T (Kehrl et al., 1991). Inibe a proliferação de células TCD4⁺ (Wahl et al., 1988; Fox et al., 1992) e pode promover a proliferação de linfócitos TCD8⁺ (Lee & Rich, 1991). Inibe também a maturação de linfócitos T citotóxicos - CTLs (Mulé et al., 1988; Tada et al., 1991), a indução de atividade das células natural "killer" - NK (Arteaga et al., 1993; Su et al., 1991) e a indução de células "killer" ativadas por linfocinas - LAK (Mulé et al., 1988). Também tem atividade inibitória na diferenciação e proliferação de células B (Kehrl et al., 1986). Em adição, o TGF- β tem a habilidade para inibir a ativação do macrófago induzida por citocinas (Tsunawaki et al., 1988; Ding et al., 1990; Barnum et al., 1994) e tem a capacidade de regular a sua própria produção por monócitos/macrófagos (Assoian et al., 1987; McCartney-Francis et al., 1990; Wahl et al., 1992), bem como a produção de outras citocinas (Chantry et al., 1989; Bogdan et al., 1992; Bogdan & Nathan, 1993).

Esta susceptibilidade diferencial de linfócitos CD4+ e CD8+ à inibição de proliferação pelo TGF- β pode contribuir ainda para a resolução de uma resposta inflamatória, uma vez que a inibição de células CD4+ maduras responsáveis pelas funções imunes mediadas por células (Yamamura et al., 1991; Salgame et al., 1991a) é quase completa, enquanto que o TGF- β é considerado menos inibitório e pode até mesmo promover a proliferação de células CD8+ (Lee & Rich, 1991). Esta população de células T CD8+ resistente à inibição, sintetiza citocinas tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 que têm ações imunossupressoras adicionais (Salgame et al., 1991a). Além disso, o efeito do TGF- β sobre linfócitos parece depender do estado de diferenciação e ativação da célula, pois células T "naive" são induzidas a proliferar enquanto células T maduras estão sujeitas à inibição de expansão clonal (Tada et al., 1991). Portanto, sob condições apropriadas, o TGF- β parece criar uma geração de moléculas com "feedback" negativo e aparentemente trabalha em conjunto com elas para reverter parte do processo imune (Wahl, 1992).

A supressão pelo TGF- β da expressão de funções efetoras de macrófagos ativados incluindo a geração de metabólitos intermediários tóxicos do oxigênio e nitrogênio (Tsunawaki et al., 1988; Ding et al., 1990; Nelson et al., 1991; Gilbert et al., 1993; Vodovotz et al., 1993; Green et al., 1994) e a produção de citocinas tipo TNF- α e IL-1 (Chantry et al., 1989; Bogdan et al., 1992; Suzumura et al., 1993), pode facilitar a sobrevivência de patógenos em tecidos. Esta atividade supressora do TGF- β tem sido demonstrada em doenças causadas por parasitas intracelulares (Sher et al., 1992) como *Leishmania* (Nelson et al., 1991; Barral-Netto et al., 1992; Barral et al., 1993; Barral-Netto & Barral, 1994; Stenger et al., 1994), *Toxoplasma gondii* (Bermudez et al., 1993), *Trypanosoma cruzi* (Silva et al., 1991), *Mycobacterium avium* (Bermudez et al., 1993) e o vírus da imunodeficiência humana (Lotz et al., 1993; Lazdins et al., 1991; Peterson et al., 1991).

No estudo de Peterson et al. (1991) foi mostrado que o TGF- β aumenta a replicação do vírus HIV-1 em culturas de células mononucleares do sangue periférico humano. Também Lazdins et al. (1991) demonstraram o

efeito *in vitro* do TGF- β 1 na progressão da infecção pelo HIV-1 em fagócitos mononucleares primários. O TGF- β latente pode ser ativado por monócitos durante a diferenciação destas células. As mudanças em fenótipo e função dos monócitos que são observadas durante esta diferenciação são também induzidas pelo TGF- β . De acordo com Lotz & Seth (1993), o TGF- β aumenta a expressão de receptor Fc γ RIII pela superfície desta célula em diferenciação e o HIV pode utilizar este receptor para infectar fagócitos mononucleares.

A regulação pelo TGF- β 1 da infecção causada pelo *Trypanosoma cruzi* *in vitro* e *in vivo* foi investigada por Silva et al. (1991). *In vitro*, o TGF- β 1 inibiu a habilidade do IFN- γ em ativar as funções efectoras citotóxicas dos macrófagos peritoneais de camundongos, com proliferação intracelular do parasita. Além disto, o tratamento de macrófagos humanos pelo TGF- β 1 sozinho, levou ao aumento da replicação do parasita nestas células. *In vivo*, em camundongos resistentes, o TGF- β 1 aumentou a parasitemia e a mortalidade em 50%. Em camundongos suscetíveis houve o desenvolvimento de altas parasitemias e morte precoce, levando a conclusão de que o TGF- β 1, produzido durante infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos, é um potente inibidor dos efeitos das citocinas ativadoras do macrófago *in vivo* e *in vitro*, e pode ter um papel na regulação da infecção.

TGF- β suprime a destruição intracelular de *Leishmania major* por macrófagos (Nelson et al., 1991). Um progressivo aumento no número de amastigotas intracelulares foi observada em culturas de macrófagos tratados com TGF- β antes da infecção com promastigotas de *Leishmania braziliensis*, enquanto as culturas não tratadas mantinham um número constante de parasitas (Barral et al., 1993). Uma observação similar foi feita durante o curso da infecção de camundongos BALB/c com *Leishmania amazonensis* que induziu a produção de TGF- β *in vitro* e *in vivo*, determinando desta forma um importante mecanismo de escape do parasita (Barral-Netto et al., 1992).

A infecção dos macrófagos com *Toxoplasma gondii*, foi associada com o aumento da produção e liberação de TGF- β e uma regulação negativa de receptores para TNF (Bermudez et al., 1993). Além disso, está envolvido na

infecção de macrófagos humanos pelo *Mycobacterium avium* associados à ausência de resposta ao IFN- γ (Bermudez, 1993).

Estes mecanismos de regulação negativa sobre a imunidade celular do hospedeiro que frequentemente acompanha as doenças infecciosas e que estão associados à produção do TGF- β , bem como seu efeito na regeneração celular, na síntese de matriz extracelular e na gênese da fibrose, poderiam ser aplicados para a hanseníase.

A hanseníase em sua forma virchowiana cursa com imunossupressão e tolerância específica para o *Mycobacterium leprae*. O aspecto especial da "ausência de resposta" pela imunidade celular na hanseníase virchowiana é que esta parece ser adquirida, ocorrendo por um longo período de tempo, e em geral não é uma ameaça à vida. Conseqüentemente a hanseníase oferece uma oportunidade ímpar de estudar a imunossupressão no homem e para a intervenção imunológica (Bloom, 1986).

A questão básica é responder qual fator estaria determinando o desenvolvimento predominante de células supressoras nesta pequena percentagem de pessoas infectadas com o *Mycobacterium leprae*, que desenvolvem a forma virchowiana.

A presença de grande quantidade de bacilos nas lesões da hanseníase virchowiana, demonstra a incapacidade dos macrófagos em processar estes microorganismos. O aspecto morfológico dessas células nas lesões sugere um estado de inatividade funcional e indiferenciação morfológica, o que contribuiria para a não formação de lesão granulomatosa e consequente falha dos mecanismos líticos, permitindo a sobrevivência do *M. leprae*. Essas alterações poderiam ser explicadas pelo menos em parte, pela presença de citocinas que inibem a atividade microbicida de macrófagos como o TGF- β 1. Por outro lado, as alterações do colágeno nas lesões de pele, nas reações e na regressão das lesões com presença de fibrose danificando nervos periféricos, principalmente na forma virchowiana, poderiam sugerir este padrão alterado de TGF- β 1 nas lesões deste polo anérgico.

No presente estudo foram utilizadas biópsias de lesões cutâneas das formas clínicas da hanseníase, dentro do espectro de manifestações clínicas, histopatológicas e imunológicas da doença, para determinar a presença da proteína TGF- β 1 por meio de imunohistoquímica, procurando correlacionar a sua presença com as formas clínicas da doença que cursam com imunossupressão específica ao *M. leprae* (LL e BL), bem como a sua ausência nas formas clínicas que cursam com intensa diferenciação macrofágica (TT e BT), com formação de granulomas epitelióides bem definidos, capazes de eliminar a grande maioria dos bacilos.

MATERIAL E MÉTODOS

Biópsias de Pele

Foram empregados blocos parafinados obtidos do arquivo do serviço de Patologia do Hospital das Clínicas (HC) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) - USP, com diagnóstico histopatológico de hanseníase. De acordo com o registro no arquivo, os blocos de biópsias de pele foram preparados após fixação dos fragmentos de tecido em formol tamponado a 10%. Cortes de 3 a 5µm foram corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Fite-Faraco para confirmação diagnóstica.

As biópsias empregadas foram correlacionadas com informações clínico-laboratoriais obtidas dos prontuários dos pacientes no arquivo médico do HC - FMRP - USP. Considerou-se relevante os seguintes parâmetros clínicos, baciloscópicos e imunológicos, respectivamente:

- ♦ a descrição e o mapeamento das lesões do paciente: características macroscópicas e quantidade das lesões descritas no formulário clínico e anotadas no diagrama corporal que constam nos prontuários dos pacientes do serviço de Dermatologia do HC - FMRP - USP;

- ♦ o resultado do índice baciloscópico (IB) do paciente: foi a média dos índices baciloscópicos de quatro esfregaços dérmicos que variou de 0 (zero) a 6 (seis), classificada de acordo com a escala logarítmica de Ridley, adotada pela Coordenação Nacional de Dermatologia Sanitária (CNDS) - Fundação Nacional de Saúde (FNS) - Ministério da Saúde (MS) (1994);

- ♦ o resultado do teste de Mitsuda do paciente: intradermo reação com antígeno integral (suspensão de bacilos mortos) e leitura feita em milímetros (mm) na quarta (4ª) semana, considerando-se positivo a induração maior ou igual a 5mm de diâmetro (CNDS-FNS-MS, 1994).

A correlação dos achados histopatológicos baseados nos critérios de Ridley & Jopling (1990) com as informações acima descritas obtidas dos prontuários, permitiu a seleção de 41 casos de hanseníase assim distribuídos:

- a)- Tuberculóide Polar (TT): seis (6) casos
- b)- Borderline-Tuberculóide (BT): sete (7) casos
- c)- Borderline-Borderline (BB): quatro (4) casos
- d)- Borderline-Lepromatoso (BL): oito (8) casos
- e)- Lepromatoso Polar (LL): 16 casos

Reação de Imunohistoquímica: Método Avidina-Biotina-Peroxidase (Complexo ABC)

Cortes de 3µm de biópsias previamente selecionadas foram desparafinadas pelo calor a 50°C por 5 minutos, seguido por 3 incubações em xilol por 5 minutos cada. Os tecidos foram rehidratados em graduação de álcoois, colocados em solução de salina tamponada com fosfato (PBS) + soro albumina bovina (BSA) 1% e tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂, 20 vol.) a 3% em metanol por 30 minutos para bloqueio da peroxidase endógena. Posteriormente os cortes foram rehidratados em bateria decrescente de álcoois (95%, 70% e 50%) e lavado em PBS + BSA 1%.

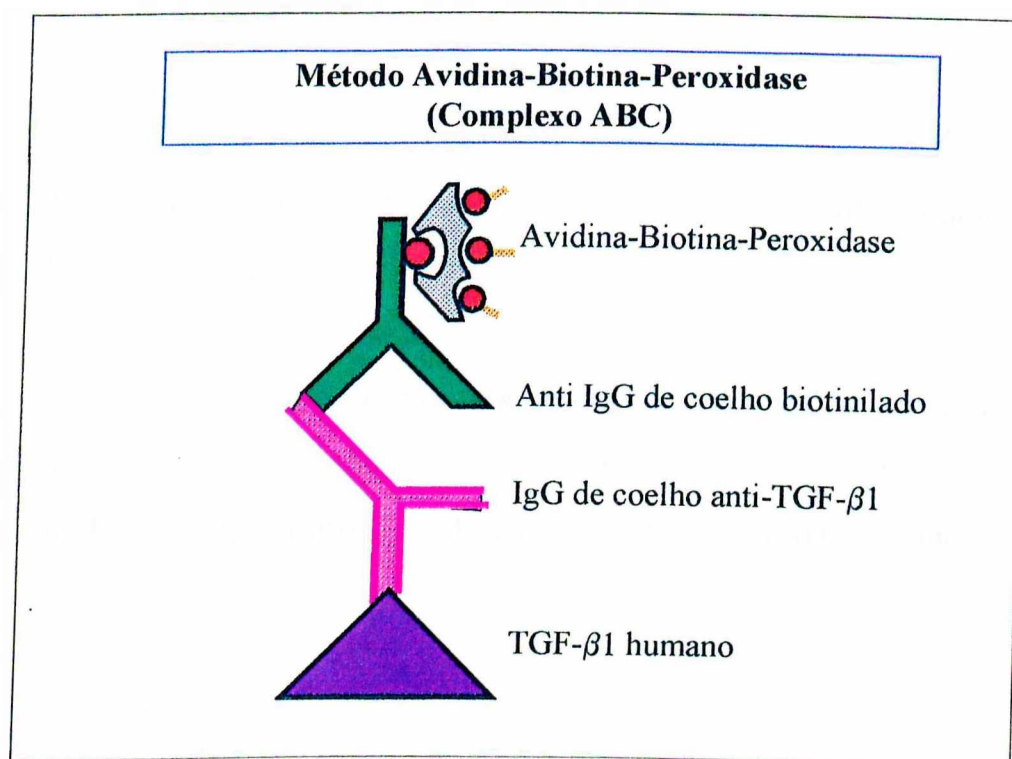
Em seguida procedeu-se a digestão enzimática para clareamento dos sítios antigênicos, empregando-se tratamento dos cortes com solução de tripsina (Sigma T - 8128: 50mg/dl em 0,05M de tampão Tris, pH 7,8 contendo cloreto de cálcio) 0,1% em PBS por 30 minutos a 37°C.

Após lavagem das lâminas com PBS + BSA 1%, as ligações protéicas inespecíficas foram bloqueadas pela incubação por 20 minutos com proteína - soro de leite a 3% (Leite desnatado Molico) e então foram incubadas com o anticorpo primário (IgG de coelho anti-TGF-β1 humano, Cat. No. AB-100-NA, R & D Systems, Minneapolis, MN). Ao final de 90 minutos à temperatura de 37°C, os cortes foram lavados e incubados com o anticorpo

secundário biotinilado (anticorpo anti-IgG de coelho produzido em cabra ligado à biotina), numa diluição 1:200 por 30 minutos à temperatura ambiente. Foi feita a remoção do excesso deste anticorpo e procedeu-se à uma incubação com o complexo avidina-peroxidase (VECTASTAIN - ABC Kit - PK4000, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, C.A.) por 30 minutos à temperatura ambiente, para detecção do produto da reação.

Para revelação da reação, adicionou-se o substrato (3-amino, 9-etil-carbazol, Sigma Chemical-Co), em tampão Tris + HCl 0,1M, contendo 0,1% de H_2O_2 por 20 minutos no escuro. Após o controle de intensidade da cor, a reação foi interrompida adicionando-se água destilada aos cortes. A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Mayer e processada a desidratação com álcool 95°GL + álcoois absolutos + xilóis, para a montagem da lâmina em meio aquoso (xarope de apaty).

A solução usada para lavagens entre cada etapa consistiu de BSA a 1% em PBS à 0,01M, pH 7,2 (Esquema 11).



Esquema 11. Reação de imunohistoquímica para imunolocalização do TGF-β1 humano em biópsias de pele.

Controles da reação:

A- Controles da especificidade

1- Substituição do anticorpo primário: as biópsias foram submetidas ao protocolo experimental com substituição do anticorpo primário (IgG de coelho anti-TGF- β 1 humano) por IgG de coelho não imune (1mg/ml), diluído 1:200.

2- Adsorção prévia do anticorpo primário: o protocolo experimental foi executado com anticorpo primário (IgG de coelho anti-TGF- β 1 humano) previamente incubado com TGF- β 1 recombinante humano (1 μ g/ml, Cat. No.1412 272, Boehringer Mannheim Biochemica) imobilizado em membrana de nitrocelulose (OLMSTED, 1986), na diluição 1:200.

B- Controles negativos

1- Biópsias de peles normais: estas biópsias normais de pacientes foram obtidas do arquivo de Patologia do HC - FMRP - USP e submetidas ao protocolo experimental acima descrito.

2- Supressão do anticorpo primário: biópsias de casos positivos para o TGF- β 1 foram submetidas ao protocolo acima descrito, porém com supressão do anticorpo primário (IgG de coelho anti-TGF- β 1 humano).

Crítérios para a leitura da reação de imunohistoquímica

A leitura das lâminas e os resultados foram expressos quanto à intensidade da reação (coloração), de acordo com os seguintes critérios:

- . (-) - ausente
- . (+/++) - leve
- . (+++) - moderada
- . (+++++) - intensa

A quantificação de células positivas presentes nas lesões observadas nas biópsias selecionadas foi expressa em percentual (%), empregando-se um critério semi-quantitativo de avaliação, feita por dois observadores.

RESULTADOS

Aspectos Histopatológicos

As biópsias de pele de pacientes com hanseníase foram inicialmente revisadas quanto ao diagnóstico histopatológico. Considerou-se a classificação de Ridley, 1990 e para tal, foram empregados cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE) e Fite-Faraco. De acordo com estes critérios foi possível agrupar as biópsias como segue abaixo:

a)-Tuberculóide Polar (TT): os seis (6) casos selecionados apresentaram em média, lesão cutânea caracterizada por infiltrado inflamatório de padrão granulomatoso. Os granulomas nesta forma polar da hanseníase mostraram-se circunscritos, com intensa diferenciação de células mononucleares, dispostas de forma organizada. O centro da lesão era geralmente composto de células epitelióides e por vezes células gigantes multinucleadas com predomínio do tipo Langhans. Na periferia da lesão identificou-se grande quantidade de células de núcleo arredondado, hipercromático e citoplasma escasso, sugestivas de células linfóides. A disposição desse grupo de células na periferia conferiu ao granuloma uma rima ou manguito celular denso que melhor circunscreveu a lesão observada nesta forma da doença. Estas lesões eram compostas de granuloma único e/ou múltiplos e por vezes confluentes. Apresentavam variação de tamanho, porém esta variação não guardou qualquer relação com a gravidade da doença.

Quanto à distribuição, essas lesões foram observadas na epiderme, na transição dermo-epidérmica, derme superficial, derme profunda e com frequência acometendo anexos e terminações nervosas cutâneas. O comprometimento epidérmico quando observado, apresentava padrão infiltrativo e destrutivo com formação de áreas de erosão.

Nas biópsias das lesões deste pólo não foram detectados bacilos álcool-ácido-resistentes (BAAR).

De acordo com informações obtidas dos prontuários dos pacientes, os seis (6) casos deste grupo apresentaram índice baciloscópico (IB) do esfregaço dérmico negativo e o teste de Mitsuda destes pacientes apresentou amplitude de variação de cinco (6) a dez (10) milímetros (mm) (Tabela 1).

b)-Borderline-Tuberculóide (BT): as lesões observadas nos sete (7) casos selecionados neste grupo apresentaram diferenciação das células mononucleares porém a quantidade e distribuição dessas células na lesão eram diferentes das observadas na lesão TT. Além de granulomas compactos e bem definidos, observou-se células epitelióides e multinucleadas gigantes tipo Langhans distribuídas ao acaso, conferindo à lesão um padrão de granuloma mais frouxo. A presença de linfócitos foi outro aspecto observado, por vezes, definindo halo contornando este granuloma e outras vezes espalhado em meio às células mononucleares epitelióides mostrando um aspecto celular misto. Nestas lesões foram identificados raros BAAR presentes em estruturas neurais e citoplasma de células mononucleares. A quantificação dos bacilos demonstrou que de acordo com o critério empregado, sua frequência foi baixa com índice baciloscópico na biópsia variando de 0 a 1+.

O índice baciloscópico dos esfregaços dérmicos destes sete (7) pacientes BT foi negativo e o resultado da leitura do teste de Mitsuda apresentou amplitude de variação de zero (0) a quatro (4) mm (Tabela 1).

c)-Borderline-Borderline (BB): os quatro (4) casos selecionados apresentaram quadro histopatológico caracterizado por infiltrado inflamatório composto em sua maioria de células epitelióides difusamente distribuídas, com padrão frouxo, sem correlação com os poucos linfócitos dispersos na lesão e ainda a presença de edema intra e intercelular.

Tabela 1. Imunohistoquímica para TGF-β1 segundo forma clínica de hanseníase, índice baciloscópico (IB), teste de Mitsuda (mm) e histopatologia.

Forma Clínica	Baciloscopia (IB)	Mitsuda (mm)	Histopatologia	Imunohistoquímica - TGF-β1	
				Intensidade	% Células Positivas
TT	0	9	granuloma T, BAAR (-)	(-)	
TT	0	7	granuloma T, BAAR (-)	(-)	
TT	0	10	granuloma T, BAAR (-)	(-)	
TT	0	8	granuloma T, BAAR (-)	(-)	
TT	0	8	granuloma T, BAAR (-)	(-)	
TT	0	6	granuloma T, BAAR (-)	(-)	
BT	0	0	granuloma BT, BAAR 1+	(-)	
BT	0	0	granuloma BT, BAAR 1+	(-)	
BT	0	4	granuloma BT, BAAR (-)	(-)	
BT	0	0	granuloma BT, BAAR (-)	(-)	
BT	0	0	granuloma BT, BAAR 1+	(-)	
BT	0	0	granuloma BT, BAAR 1+	(-)	
BT	0	3	granuloma BT, BAAR 1+	(-)	
BB	1,0	0	granuloma BB, BAAR 1+	+++	20 - 30%
BB	2,0	0	granuloma BB, BAAR 2+	+++ /++++	30 - 40%
BB	1,0	0	granuloma BB, BAAR 1+	+++	40 - 50%
BB	2,5	0	granuloma BB, BAAR 2+	+++	40 - 50%
BL	2,0	0	infiltrado BL, BAAR 2+	+++ /++++	30 - 40%
BL	3,0	0	infiltrado BL, BAAR 3+	++++	40 - 50%
BL	3,0	0	infiltrado BL, BAAR 2+	++++	60 - 70%
BL	3,0	0	infiltrado BL, BAAR 2+	++++	70 - 80%
BL	2,0	0	infiltrado BL, BAAR 3+	++++	30 - 40%
BL	2,5	0	infiltrado BL, BAAR 2+	++++	40 - 50%
BL	3,0	0	infiltrado BL, BAAR 2+	++++	50 - 60%
BL	2,0	0	infiltrado BL, BAAR 3+	++++	70 - 80%
LL	3,5	0	infiltrado LL, BAAR 4+	++++	70 - 80%
LL	3,0	0	infiltrado LL, BAAR 3+	++++	50 - 60%
LL	3,0	0	infiltrado LL, BAAR 4+	++++	70 - 80%
LL	4,0	0	infiltrado LL, BAAR 4+	++++	70 - 80%
LL	4,0	0	infiltrado LL, BAAR 5+	++++	70 - 80%
LL	3,0	0	infiltrado LL, BAAR 4+	++++	60 - 70%
LL	3,5	0	infiltrado LL, BAAR 4+	++++	60 - 70%
LL	3,0	0	infiltrado LL, BAAR 5+	++++	70 - 80%
LL	3,0	0	infiltrado LL, BAAR 4+	++++	70 - 80%
LL	3,0	0	infiltrado LL, BAAR 3+	++++	60 - 70%
LL	3,0	0	infiltrado LL, BAAR 3+	++++	70 - 80%
LL	3,5	0	infiltrado LL, BAAR 3+	++++	70 - 80%
LL	4,0	0	infiltrado LL, BAAR 5+	++++	60 - 70%
LL	4,5	0	infiltrado LL, BAAR 5+	++++	60 - 70%
LL	5,0	0	infiltrado LL, BAAR 6+	++++	80 - 90%
LL	3,0	0	infiltrado LL, BAAR 3+	++++	60 - 70%

N = 41 casos (TT = 6; BT = 7; BB = 4; BL = 8 e LL = 16).

A pesquisa de BAAR demonstrou índice baciloscópico na biópsia variando de 1+ a 2+, enquanto a amplitude de variação do índice baciloscópico dos esfregaços dérmicos foi de 1,0 a 2,5. A leitura do teste de Mitsuda foi negativa nos quatro pacientes BB (Tabela 1).

d)-Borderline-Lepromatoso (BL): dos casos estudados, oito (8) deles apresentaram infiltrado inflamatório composto de macrófagos agregados conferindo à lesão um padrão granulomatoso. Presença de poucas células epitelióides e grande quantidade de macrófagos imaturos caracterizados por núcleo arredondado e citoplasma amplo de padrão espumoso denominados células de Virchow. O índice baciloscópico nas biópsias destes casos variou de 2+ a 3+, com bacilos geralmente no citoplasma destas células de Virchow. Nesta forma de hanseníase foi usual a detecção de áreas de denso infiltrado linfocitário, comprometendo anexos e terminações nervosas. Nos esfregaços dérmicos, conforme informações dos prontuários, o índice baciloscópico teve amplitude de variação de 2,0 a 3,0 e o teste de Mitsuda foi negativo em todos os pacientes desta forma clínica (Tabela 1).

e)- Lepromatoso Polar (LL): foram selecionados 16 casos que apresentaram geralmente infiltrado inflamatório difuso em toda extensão da derme, com preservação apenas da região subepidérmica com a delimitação de uma faixa (faixa de Unna) que separa o infiltrado da epiderme. A epiderme embora não apresentou infiltrado inflamatório, mostrou-se fina e achatada. O infiltrado inflamatório era composto de células macrofágicas imaturas com grande carga de bacilos (BAAR) em seu citoplasma, conferindo um aspecto espumoso à estas células (células de Virchow). O índice baciloscópico nas biópsias variou de 3+ a 6+. Todos os casos deste grupo apresentaram índice baciloscópico dos esfregaços dérmicos positivos com variação de 3,0 a 5,0 e o teste de Mitsuda negativo (Tabela 1).

Achados Imunohistoquímicos

Os resultados da detecção de TGF- β 1 em lesões de diferentes formas clínicas de hanseníase empregando-se anticorpo policlonal anti-TGF- β 1 no método avidina-biotina-peroxidase (complexo ABC), foram avaliados de acordo com a quantidade (percentual) de células positivas e a intensidade da reação (coloração) nas lesões examinadas. Os resultados estão sumarizados na Tabela 1.

a) **Tuberculóide Polar (TT):** ausência de imunorreatividade para TGF- β 1 nas lesões cutâneas (Figura 1).

b) **Borderline-Tuberculóide (BT):** ausência de imunorreatividade para o TGF- β 1 nas lesões cutâneas (Figura 2).

c) **Borderline-Borderline (BB):** presença de imunorreatividade para o TGF- β 1 nos quatro (4) casos selecionados BB. A reação foi positiva em um percentual de células que variou de 20 a 50%. Esta reação foi detectada no citoplasma de macrófagos e apresentou reatividade moderada (+++) (Figura 3).

d) **Borderline-Lepromatoso (BL):** presença de imunorreatividade para o TGF- β 1 nos oito (8) casos selecionados BL. A reação foi positiva em um percentual de células que variou de 30 a 80%. Esta reação foi detectada no citoplasma de macrófagos e apresentou reatividade intensa (+++++) (Figura 4).

e) **Lepromatoso Polar (LL):** presença de imunorreatividade para o TGF- β 1 nos 16 casos selecionados LL. A reação foi positiva em um percentual de células que variou de 50 a 90%. Esta reação foi detectada no citoplasma de macrófagos e apresentou reatividade intensa (+++++) (Figura 5).

Com relação aos controles, não foi observada imunorreatividade para o anticorpo anti-TGF- β 1 nas biópsias de pele normal. Imunorreatividade também não foi detectada nos casos sabidamente positivos em que o anticorpo primário foi previamente adsorvido com TGF- β 1 recombinante humano ou foi substituído por IgG de coelho não imune ou quando foi suprimido da reação.

Figura 1. Tuberculóide Polar: Lesão cutânea caracterizada por infiltrado inflamatório granulomatoso de padrão epitelióide bem definido (A). A lesão é composta de células fagocitárias mononucleares em diferentes graus de diferenciação. Quanto a distribuição na lesão, as células estão dispostas de forma organizada, caracterizando um tubérculo. No centro estão células epitelióides e as células multinucleadas gigantes. Na periferia estão localizados os macrófagos e células de citoplasma escasso e núcleo hipercromático, com características de linfócitos (C). O infiltrado inflamatório compromete a derme superficial e a profunda, com atividade na junção dermo-epidérmica. Ausência de imunorreatividade para a proteína TGF- β 1 (B e D). A e C, Hematoxilina e Eosina, 250X e 400X, respectivamente. B e D, Avidina-Biotina-Peroxidase para TGF- β 1, contracoloração de Hematoxilina de Mayer, 250X e 400X, respectivamente.

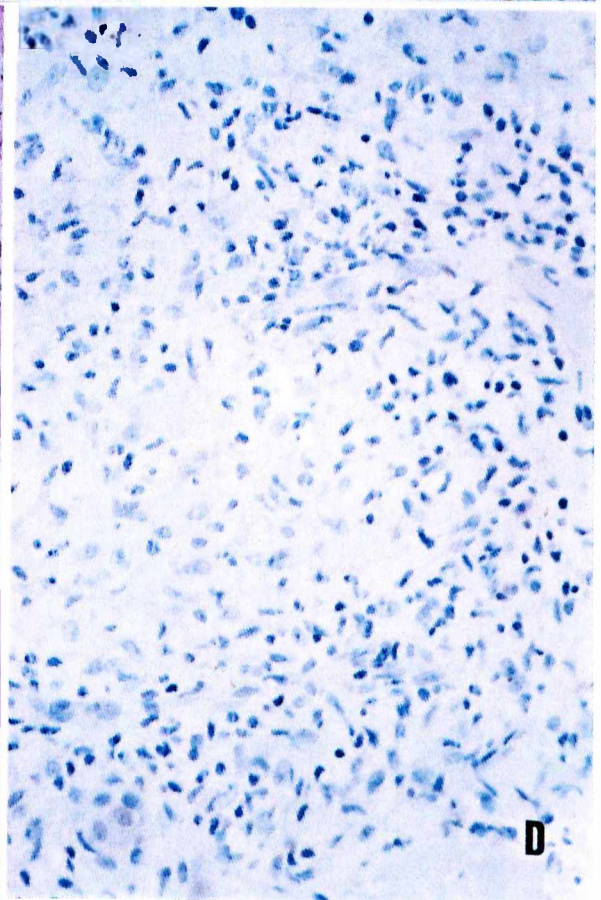
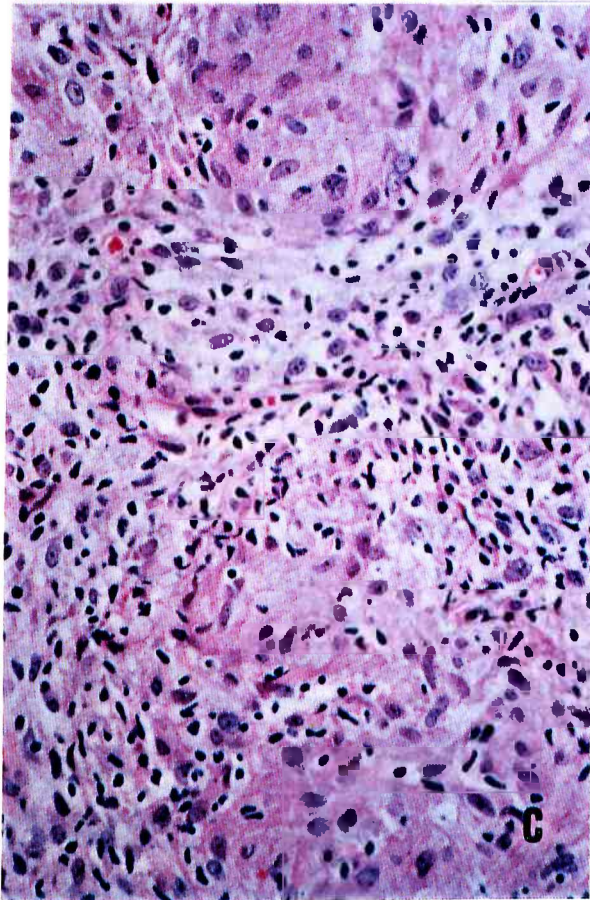
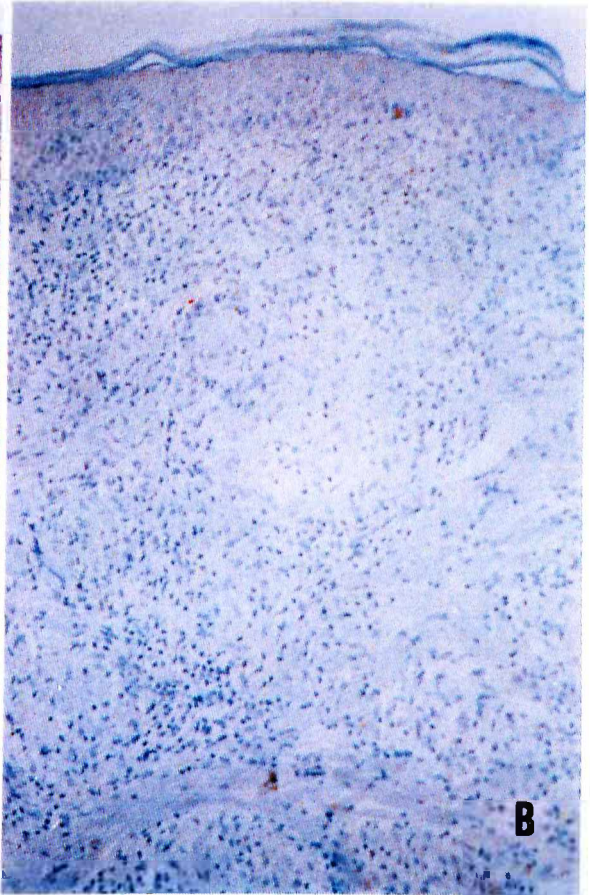
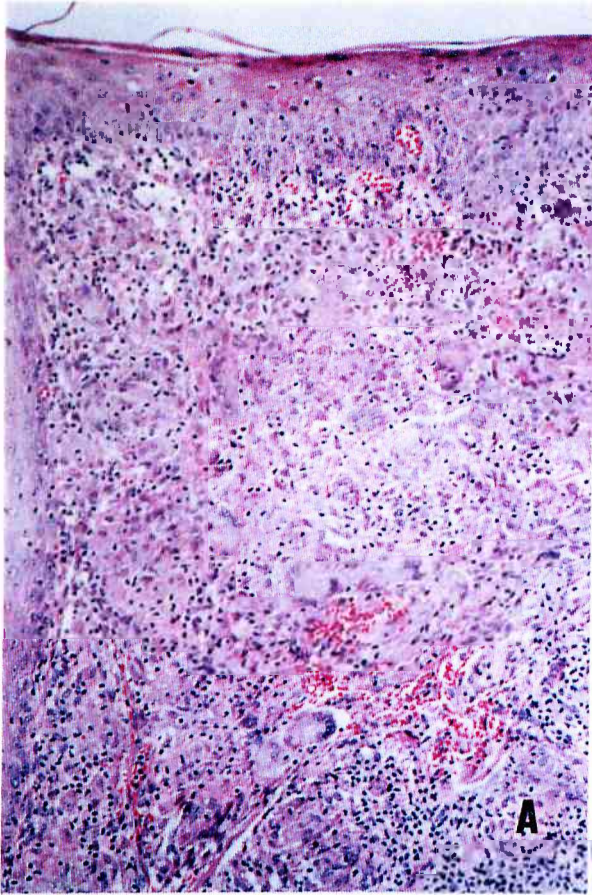


Figura 2. **Borderline-Tuberculóide:** Lesão cutânea caracterizada por infiltrado inflamatório granulomatoso de padrão epitelióide frouxo (A). A lesão é composta de células fagocitárias mononucleares em diferentes graus de diferenciação. Apesar da diferenciação, as células estão distribuídas ao acaso, com edema discreto intra e extracelular, observando-se íntimo contato entre linfócitos, células epitelióides e célula multinucleada gigante do tipo corpo estranho (C). O infiltrado inflamatório compromete a derme superficial e a profunda, com atividade na junção dermo-epidérmica ausente. Ausência de imunorreatividade para a proteína TGF- β 1 (B e D). A e C, Hematoxilina e Eosina, 250X e 400X, respectivamente. B e D, Avidina-Biotina-Peroxidase para TGF- β 1, contracoloração de Hematoxilina de Mayer, 250X e 400X, respectivamente.

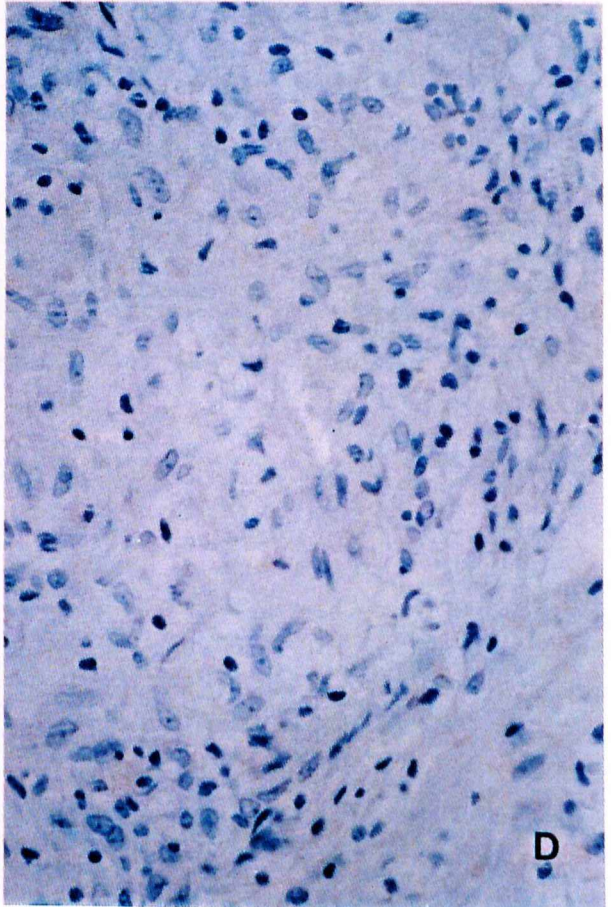
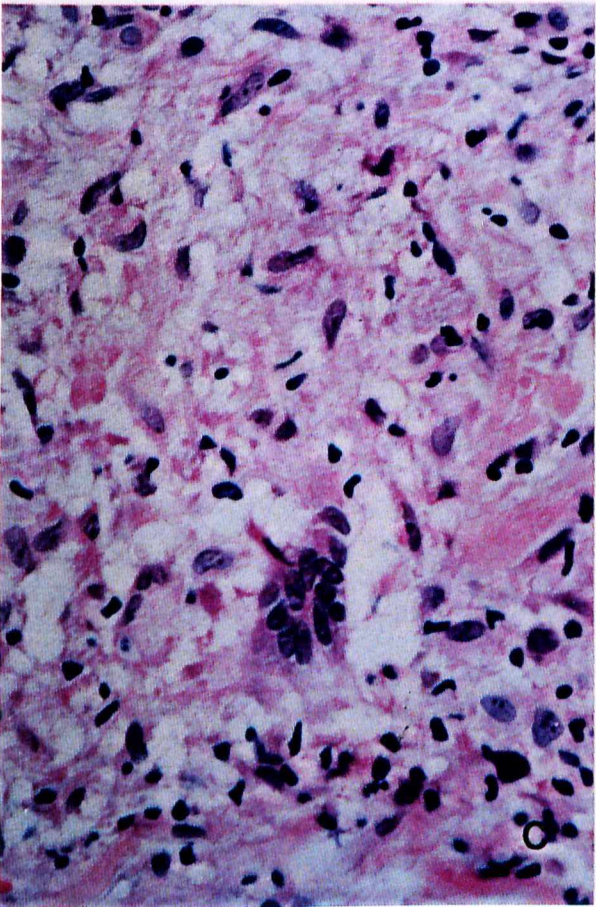
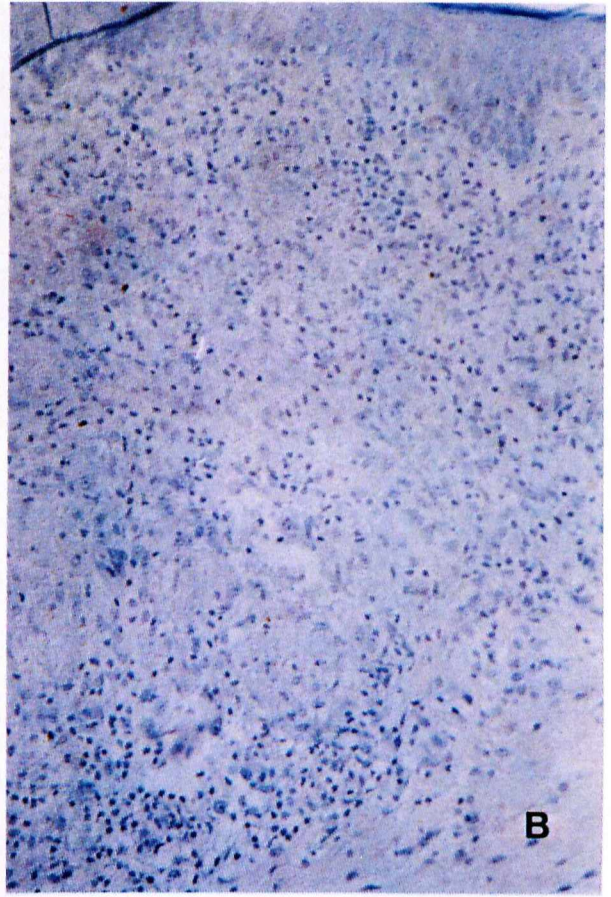
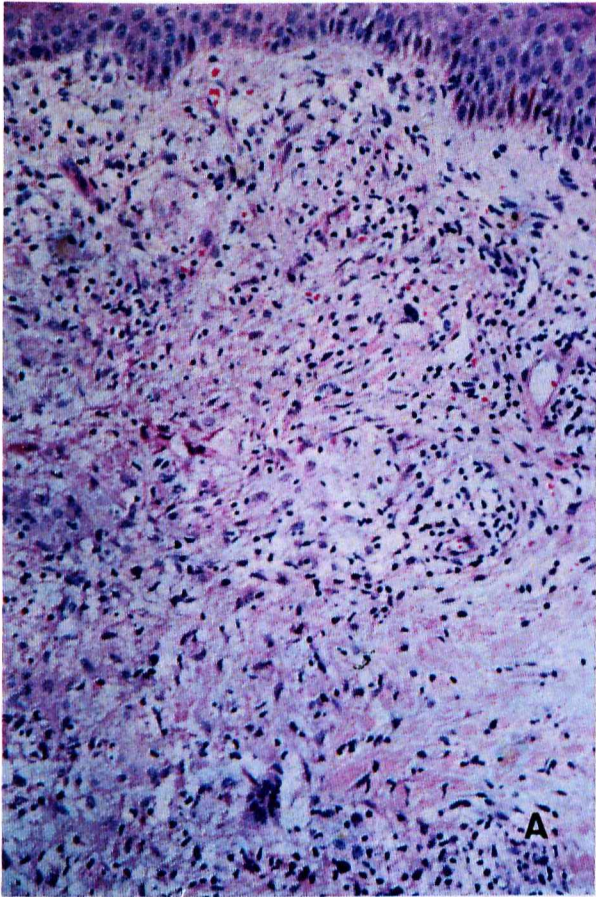


Figura 3. **Borderline-Borderline:** Lesão cutânea caracterizada por infiltrado inflamatório granulomatoso de padrão epitelióide frouxo (A). A lesão é parcialmente circunscrita e composta predominantemente de células epitelióides, dissociadas por edema de intensidade moderada. São observados poucos linfócitos em meio a macrófagos de citoplasma espumoso (C). Presença de imunorreatividade para a proteína TGF- β 1 (B e D) no citoplasma das células fagocitárias mononucleares. A e C, Hematoxilina e Eosina, 250X e 400X, respectivamente. B e D, Avidina-Biotina-Peroxidase para TGF- β 1, contracoloração de Hematoxilina de Mayer, 250X e 400X, respectivamente.

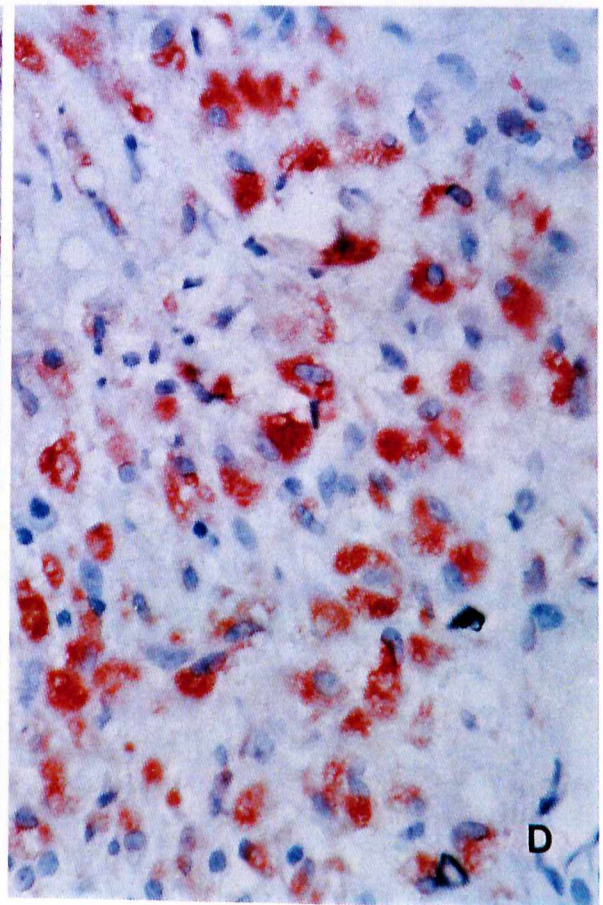
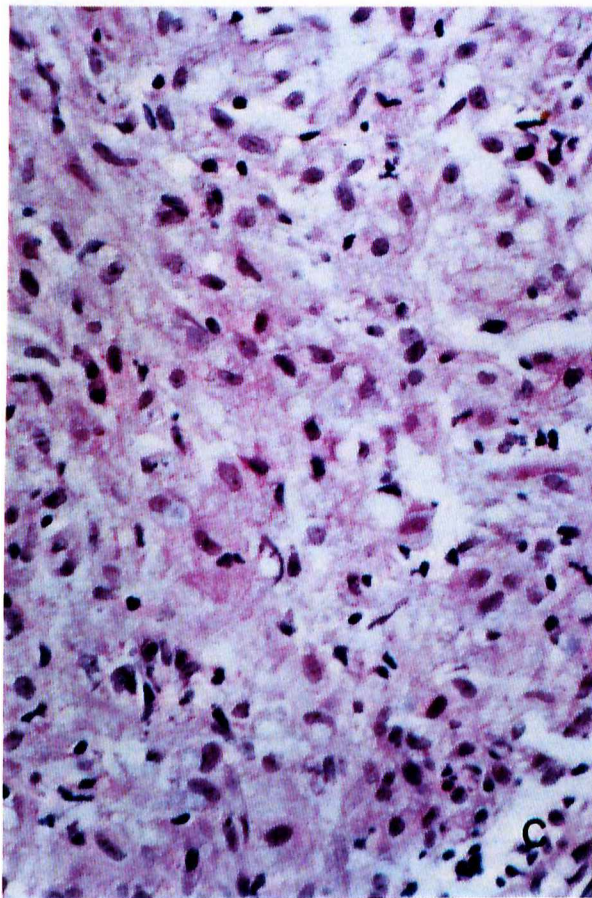
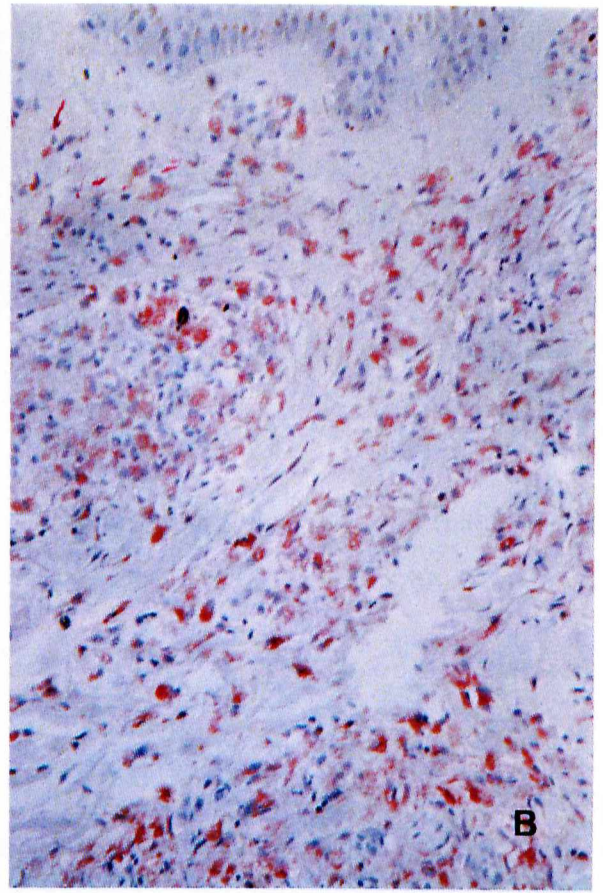
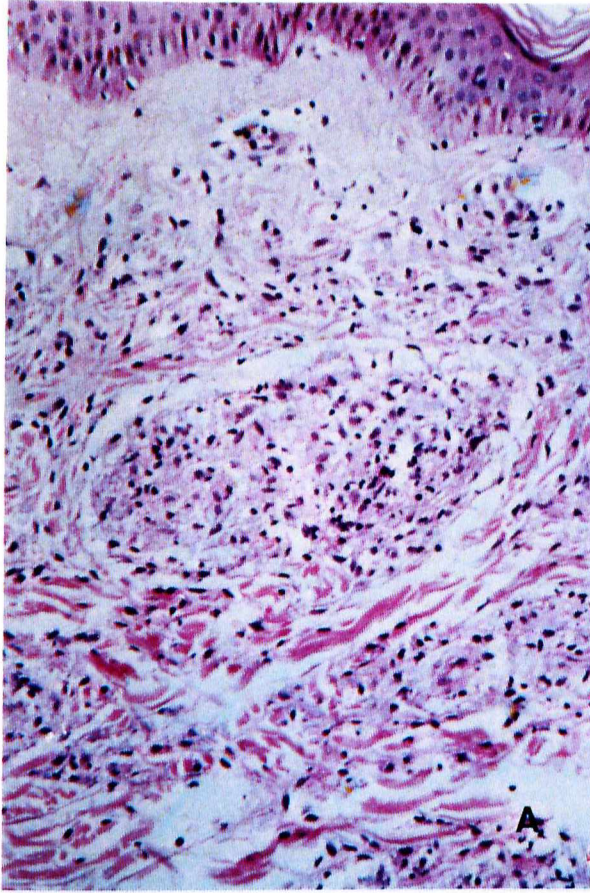


Figura 4. **Borderline-Lepromatoso:** : Lesão cutânea caracterizada por infiltrado inflamatório histiocitário (A). A lesão é parcialmente circunscrita e composta predominantemente de células histiocitárias de citoplasma amplo e espumoso e com quantidade variável de vacúolos. São observados linfócitos em quantidade variável em meio aos macrófagos que apresentam, às vezes, núcleo pouco definido (C). Presença de imunorreatividade para a proteína TGF- β 1 (B e D) no citoplasma das células fagocitárias mononucleares. A e C, Hematoxilina e Eosina, 250X e 400X, respectivamente. B e D, Avidina-Biotina-Peroxidase para TGF- β 1, contracoloração de Hematoxilina de Mayer, 250X e 400X, respectivamente.

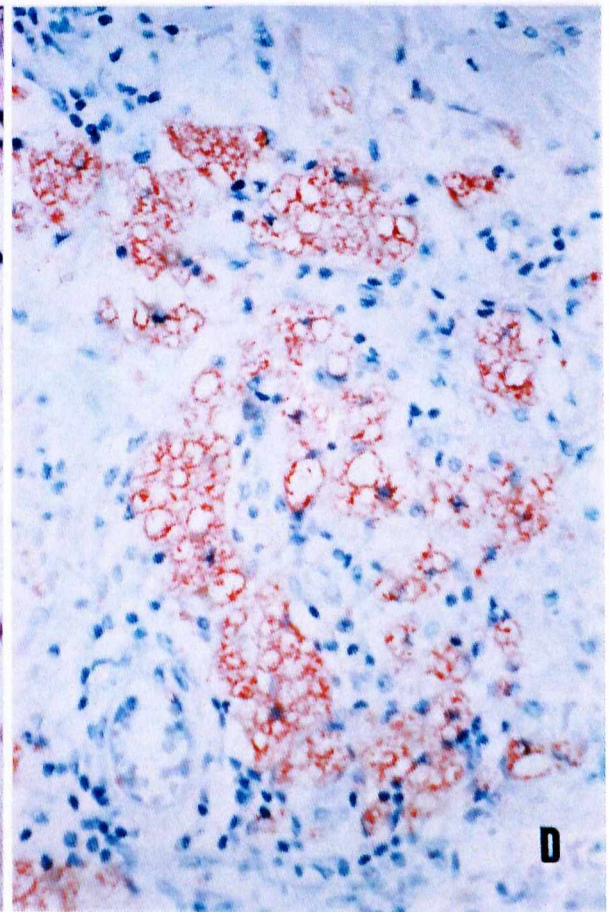
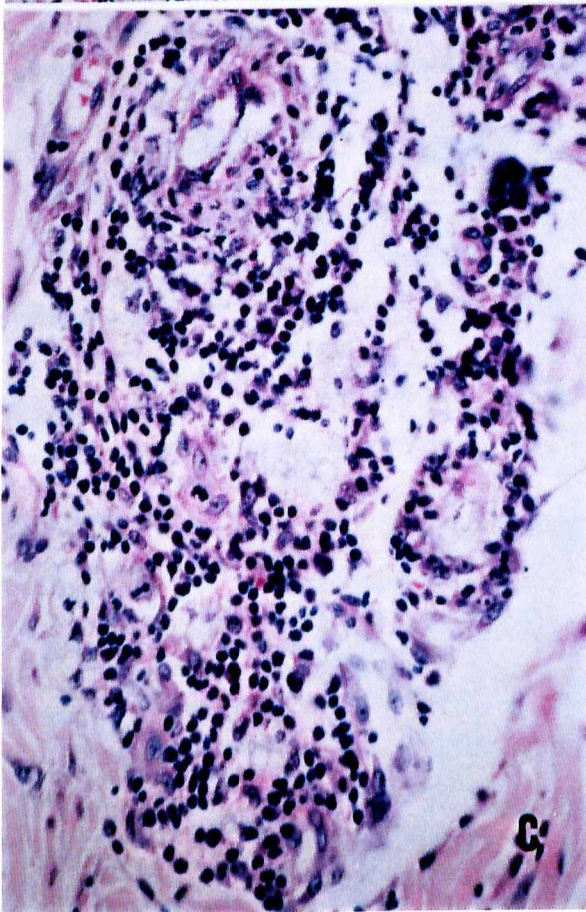
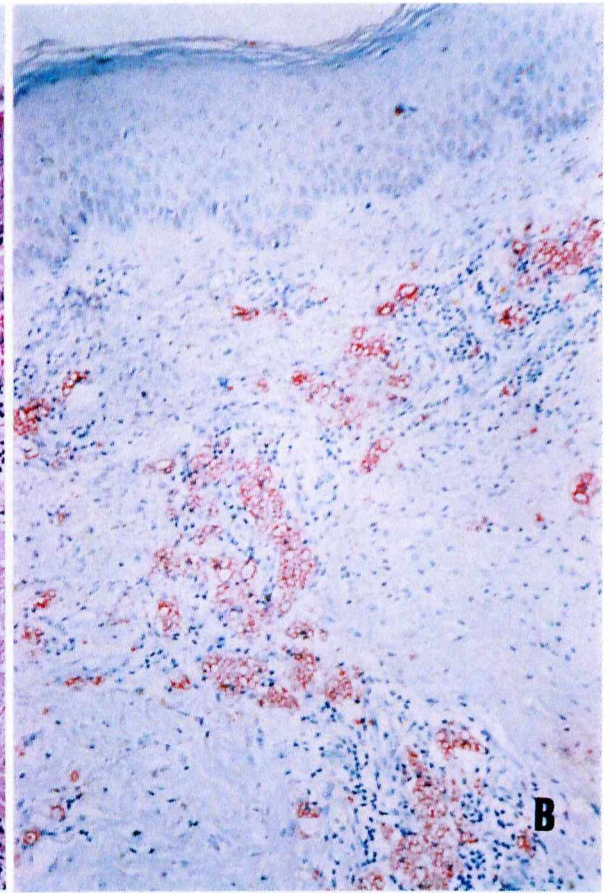
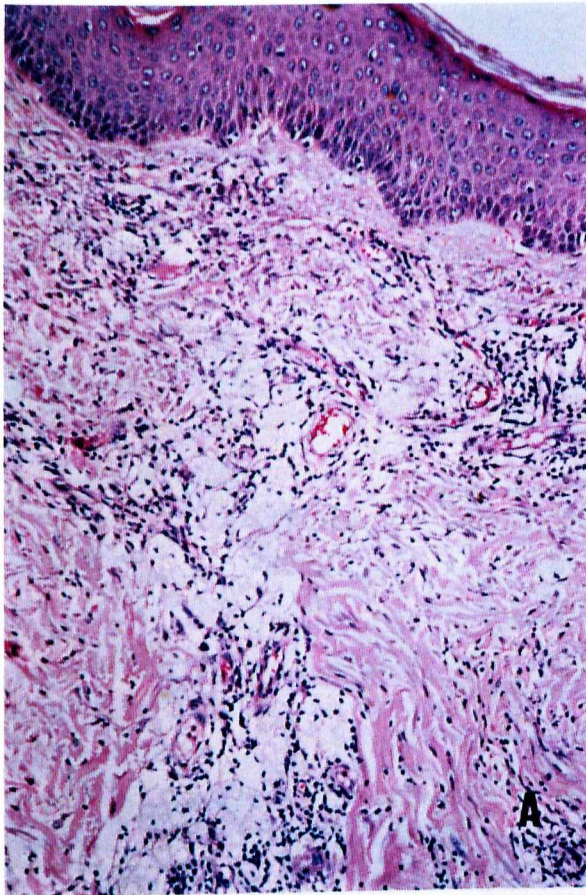
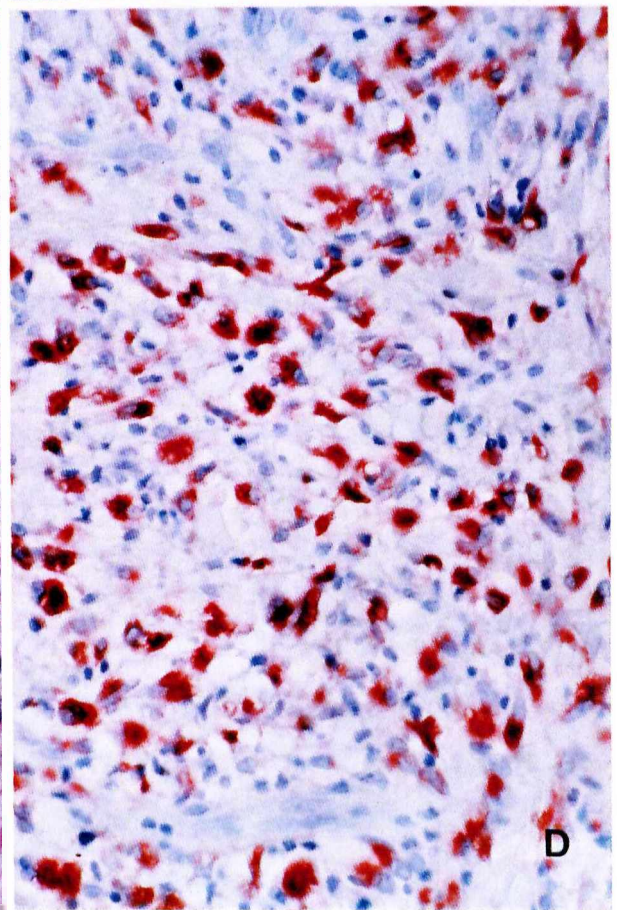
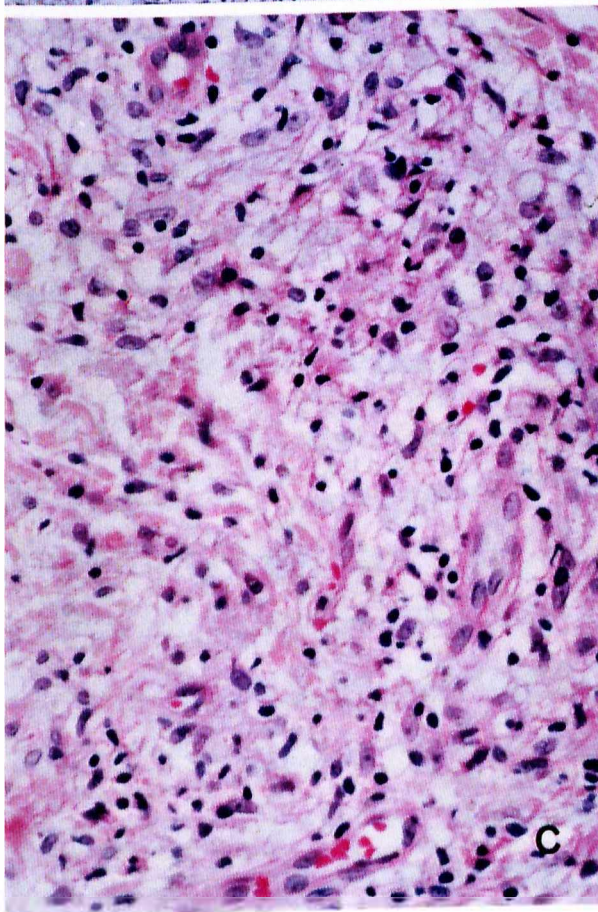
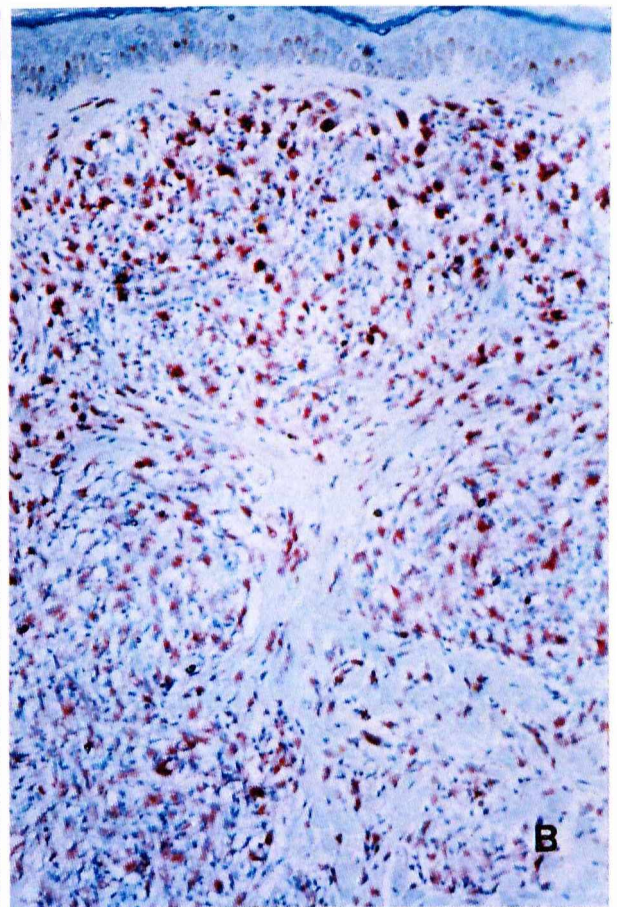
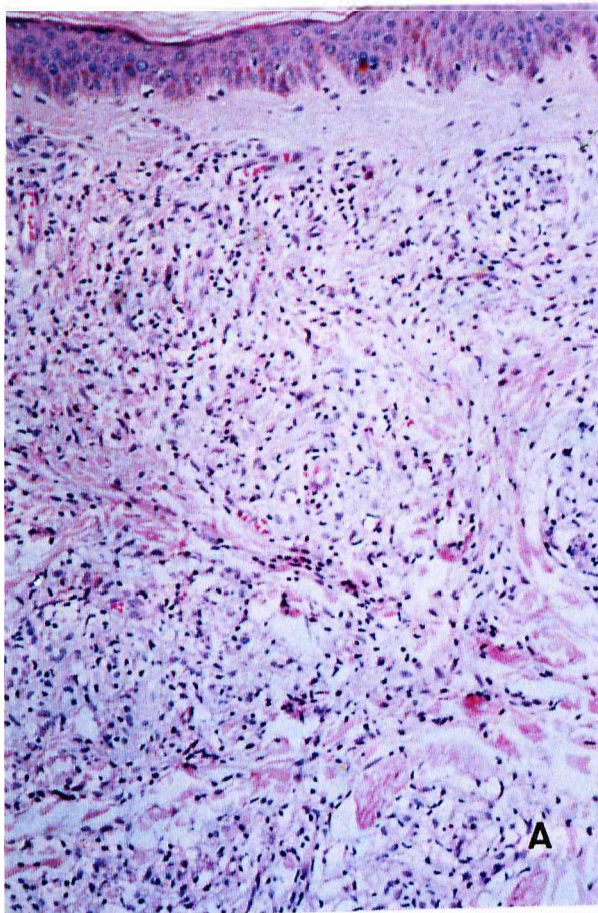


Figura 5. **Lepromatoso Polar:** Lesão cutânea caracterizada por infiltrado inflamatório histiocitário difuso (A). A lesão é composta predominantemente de células histiocitárias de citoplasma amplo e espumoso e com quantidade variável de vacúolos, associados a raros linfócitos (C). Muitos histiócitos não apresentam definição do núcleo. Presença de imunorreatividade para a proteína TGF- β 1 (B e D) no citoplasma das células fagocitárias mononucleares. A e C, Hematoxilina e Eosina, 250X e 400X, respectivamente. B e D, Avidina-Biotina-Peroxidase para TGF- β 1, contracoloração de Hematoxilina de Mayer, 250X e 400X, respectivamente.



DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os resultados mostram a proteína TGF- β 1 em macrófagos de lesões dérmicas das formas lepromatosa, borderline-lepromatosa e borderline-borderline da hanseníase, demonstrando que esta citocina está envolvida nos mecanismos fisiopatológicos da formação das lesões cutâneas destas formas localizadas no pólo de maior susceptibilidade da doença. De acordo com Ridley & Jopling (1966), nestas formas clínicas, há uma ausência de resposta celular à antígenos do *Mycobacterium leprae* e as lesões na derme são difusas, com macrófagos pouco diferenciados e com grande carga bacilar no citoplasma. No outro pólo do espectro de manifestações clínicas, nas formas tuberculóide e borderline-tuberculóide, formas de resistência, os nossos resultados mostram ausência de imunorreatividade para o polipeptídeo TGF- β 1 nas lesões dérmicas, favorecendo a hipótese de que a formação de lesões que envolvem um processo granulomatoso, não estaria associada com a presença de TGF- β 1. Como já descrito (Ridley & Jopling, 1966), estas lesões são granulomatosas, bem definidas, com macrófagos diferenciados e poucos bacilos. Este padrão de resposta é dependente da imunidade mediada por células (Ridley & Jopling, 1966). A diferenciação entre essas respostas sugere a presença de uma via comum que poderia estar sendo mediada pela citocina TGF- β 1, considerando sua natureza bifuncional como molécula pró-inflamatória e imunossupressora (Wahl, 1992). A ausência de TGF- β 1 poderia explicar, pelo menos em parte, a exacerbação da resposta imune celular responsável pela imunopatogênese na forma tuberculóide, enquanto a sua presença, provavelmente em sinergia com outras moléculas, poderia levar à supressão da imunidade celular na forma lepromatosa.

Na forma tuberculóide, fagócitos mononucleares ativados, células T-citotóxicas, células natural "killer" (NK) e células "killer" ativadas por linfocinas (LAK), criam o microambiente da imunidade mediada por células, associadas à ação de moléculas efetoras, tais como IFN- γ e TNF- α , que ativam

macrófagos a produzir reativos intermediários do oxigênio (ROI), ânions superóxido (O_2^-) (Murray et al., 1985) e reativos intermediários do nitrogênio (RNI) (Chan et al., 1992), que efetivamente matam microorganismos intra e extracelulares. Além disso, IL-2 e IL-6 influenciam células T, NK e LAK a tornarem-se citolíticas por aumentar seu conteúdo de "perforina" (proteína formadora de poro) e leucalexina (Rappolee & Werb, 1988). Estas interleucinas modificam as funções de outras células tais como as células endoteliais, queratinócitos e células de Langerhans. Todos estes fatores atuam conjuntamente sobre as funções celulares, *in situ*, e também recrutam células apropriadas da circulação, levando à formação do granuloma imune para a destruição do *M. leprae* (Sengupta, 1993).

Nas lesões tuberculóides, os macrófagos ativados, com diferenciação epitelióide, são capazes de exercer sua atividade microbicida (Iyer et al., 1990a e 1990b; Khare et al., 1993), conseguindo processar o bacilo e apresentá-lo no contexto das moléculas do complexo de histocompatibilidade principal-classe II, HLA-DR (Modlin & Bloom, 1993), aos receptores de células TCD4+. Estas células estão presentes no granuloma tuberculóide numa relação CD4+:CD8+ igual a 2:1 (Modlin et al., 1983c) e estão ativadas, pois a taxa Tmemória: T"naive" na lesão é 14:1 (Modlin et al., 1988). Tem sido descrito que células T ativadas secretam grandes quantidades de IL-2 e IFN- γ , duas citocinas típicas do padrão Th1 que predominam nestas lesões (Yamamura et al., 1991) e respectivamente, estimulam a expansão clonal de células T antígeno-específicas e ativam macrófagos a liberar radicais microbicidas, potencializando ainda mais a eliminação de bacilos. Por outro lado, a IL-2 estimula a expansão clonal de células TCD8+ de fenótipo CD28+ (citotóxica) que predominam nestas lesões (Modlin et al., 1988), e populações de células natural "killer" (NK) que estão ativadas neste pólo (Kaleab et al., 1990a e 1990b; Steinhoff et al., 1988; Sasiain et al., 1992). Estes três tipos de células podem produzir IFN- γ , que é a principal citocina responsável por ativar mecanismos bactericidas dentro do macrófago parasitado (Murray et al., 1985; Nathan et al., 1983, 1986; Sivasai et al., 1993). No granuloma há ainda um

predomínio de IL-1 β e TNF- α (Arnoldi et al., 1990; Flad et al., 1990), que são citocinas com atividade inflamatória, relacionadas diretamente com a formação do granuloma, caracterizando um mecanismo de manutenção do processo inflamatório com exacerbação da resposta imune celular, com ativação de células Th1 induzidas a proliferar pela presença de IL-12 nas lesões tuberculóides (Sieling et al., 1994).

Esta imunidade celular na forma tuberculóide protege o indivíduo contra a disseminação bacilar mas está diretamente envolvida na imunopatogênese do dano neural e da pele (Ottenhoff, 1994). Isto é compatível com os nossos resultados que demonstram que a avaliação clínica desta imunidade celular nestes pacientes feita pelo teste de Mitsuda foi positiva (6,0 a 10 mm) e o índice baciloscópico foi negativo em todos os esfregaços dérmicos.

A somatória destes mecanismos descritos acima estaria proporcionando o tipo de resposta imunológica encontrada nas lesões da hanseníase tuberculóide, não sendo descrito nenhum fator regulador do processo de hiperreatividade imune celular.

Sendo o TGF- β 1 um imunossupressor potente (Wahl, 1992) com capacidade de inibir a ativação de macrófagos (Tsunawaki et al., 1988; Ding et al., 1990; Vodovotz et al., 1993; Bogdan & Nathan, 1993), tendo ação direta na regulação da resposta imune celular, a sua ausência nas lesões de hanseníase tuberculóide como demonstrado no presente trabalho, estaria, provavelmente, associada a esta exacerbação da resposta imune mediada por células, ocorrendo então a diferenciação macrofágica, formação de granulomas bem definidos e a destruição bacilar.

A presença de uma síndrome inflamatória difusa, caracterizada por infiltrado massivo de células mononucleares com intensa ativação macrofágica e formação de granulomas, foi demonstrada em camundongos com deleção do gene para o TGF- β 1 (Shull et al., 1992; Kulkarni et al., 1993). Esta resposta inflamatória exacerbada assemelhou-se às lesões encontradas em doenças auto-imunes e certas doenças infecciosas. Estes camundongos com inativação do

gene para o TGF- β 1 sobrevivem várias semanas enquanto é feito o suporte de TGF- β 1 materno (Shull et al., 1992; Letterio et al., 1994); depois morrem de uma doença sistêmica do tipo auto-imune, na qual as concentrações de TNF e IL-1 estão marcadamente elevadas. Desde que o TGF- β 1 é conhecido por inibir a atividade da IL-1, TNF- α , IFN- γ e IL-6, poder-se-ia supor que na ausência de TGF- β 1, estas citocinas terão suas atividades pró-inflamatórias aumentadas, sendo concordante com investigações feitas na hanseníase que demonstraram uma correlação da lesão tuberculóide com a presença predominante destas citocinas IL-1 β , TNF- α (Arnoldi et al., 1990; Flad et al., 1990), IFN- γ (Yamamura et al., 1991; Volc-Platzer et al., 1988; Arnoldi et al., 1990; Flad et al., 1990; Scollard, 1991) e IL-2 (Longley et al., 1985; Modlin et al., 1984; Yamamura et al., 1991; Flad et al., 1990; Scollard, 1991). Em monócitos do sangue periférico também foi demonstrado que TNF- α (Silva & Foss, 1989; Barnes et al., 1992), IL-1 e IL-6, estão em concentrações elevadas na forma tuberculóide, quando comparadas aos doentes com a forma lepromatosa¹.

Adicionalmente à presença destas citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1, a falta do TGF- β 1 poderia causar desregulação com redução de citocinas supressoras tais como IL-4 e IL-10, as quais estão ausentes nas lesões cutâneas da forma tuberculóide (Yamamura et al., 1991), o que poderia resultar em uma cascata de citocinas pró-inflamatórias, com aumento da função citolítica das células CTLs, LAK e NK, contribuindo provavelmente, para esta exacerbação da resposta imune mediada por células, pois esta função é normalmente inibida pelo TGF- β 1 (Mulé et al., 1988; Tada et al., 1991; Su et al., 1991; Arteaga et al., 1993) (Esquema 12). Além disso, a infiltração intensa de células inflamatórias nas lesões dérmicas poderia estar associada também à perda dos efeitos supressores do TGF- β 1 sobre a adesividade de neutrófilos e linfócitos às células endoteliais (Gamble & Vadas, 1988 e 1991).

¹ Comunicação pessoal - Prof^ª Dr^ª Norma T. Foss

Bloom & Mehra, 1984; Modlin et al., 1986a; Modlin et al., 1986c). Estas células TCD8+ destes pacientes atuam suprimindo a resposta de células TCD4+ por meio da liberação de IL-4 (Salgame et al., 1991; Bloom et al., 1992), citocina que interage com a população CD4+ do tipo Th1, dificultando ou inibindo a sua ativação (Modlin & Bloom, 1993).

Embora inúmeros mecanismos tenham sido aventados para explicar a supressão da resposta imune contra o *M. leprae*, algumas citocinas poderiam estar atuando diretamente nos mecanismos efetores controladores da infecção como o TGF- β 1 que, de acordo com os nossos resultados, apresentou reatividade intensa nas lesões do pólo lepromatoso. Em consonância com os nossos resultados, o padrão de células T demonstrado nas lesões da forma virchowiana (Modlin & Bloom, 1993), poderia ser explicado, pelo menos em parte, pela presença do TGF- β 1 nestas lesões. Esta citocina atuaria inibindo a proliferação de células TCD4+ (Wahl et al., 1988), que se encontram numa pequena proporção na forma LL (Modlin & Rea, 1987), e estimulando a proliferação e maturação das células supressoras TCD8+ de forma sinérgica (Lee & Rich, 1991).

Paralelamente, TGF- β 1 teria ação inibitória sobre a maturação de linfócitos T citotóxicos (Mulé et al., 1988; Tada et al., 1991) além de inibir a atividade de células NK (Mulé et al., 1988; Arteaga et al., 1993; Su et al., 1991), comprometendo efetivamente as funções citolíticas destas células. A habilidade do TGF- β 1 para inibir a expressão de proteína formadora de poro pelas células TCD8+ (Smyth et al., 1991), provavelmente, contribui para a diminuição geral da atividade citotóxica como já foi demonstrado na forma lepromatosa (Steinhoff et al., 1988; Kaleab et al., 1990a e 1990b; Sasiain et al., 1992). Esta hipótese é consistente com os resultados demonstrados por Barral-Neto & Barral (1994) em que o TGF- β deprime o efeito estimulatório do IFN- γ sobre a geração de células citotóxicas em células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea, quando estimuladas com antígenos do parasita.

O efeito do TGF- β 1 sobre linfócitos parece depender do estado de diferenciação e ativação destas células justificando parcialmente, o predomínio de células CD4+ "naive" nestas lesões LL, pois esta subclasse de células T na presença do TGF- β 1 é induzida a proliferar, enquanto células T maduras estão sujeitas à inibição da expansão clonal por esta citocina (Tada et al., 1991; Wahl, 1992).

TGF- β está envolvido na geração ou função de células T supressoras CD8+ (Miller et al., 1992), que são induzidas a proliferar na presença de TGF- β 1 (Lee & Rich, 1991), sintetizando citocinas tipo Th2 tais como IL-4, IL-5 e IL-10 que têm ações supressoras adicionais (Salgame et al., 1991a), alimentando positivamente a depressão celular na forma lepromatosa. Estas citocinas Th2 predominam nas lesões desta forma clínica como descrito por Yamamura et al., 1991. Corroborando esta hipótese, o estudo de Barral et al. (1993) demonstrou que a administração de TGF- β em um modelo de resistência à infecção com *L. braziliensis*, aboliu o padrão de cura observado em camundongos e, também, levou ao desenvolvimento de uma resposta tipo Th2, com diminuição da produção de IFN- γ e aumento dos níveis de RNAs mensageiros de IL-10. Observação semelhante, foi feita em modelo complementar no qual camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* foram tratados *in vivo* com anticorpo monoclonal anti-TGF- β , o qual preveniu o desenvolvimento da lesão, com aumento dos níveis de RNAs mensageiros de IFN- γ , enquanto nos controles, houve aumento dos níveis de RNAs mensageiros de IL-4 e baixos níveis de IFN- γ (Barral-Netto et al., 1992).

Desta forma a presença de TGF- β 1 nas lesões de virchowianos, como observado neste trabalho, poderia atuar induzindo exacerbação de citocinas desativadoras de macrófagos tipo IL-10 e IL-4 (Bogdan & Nathan, 1993), as quais têm capacidade de inibir a resposta Th1 (Mosmann & Moore, 1991), com consequente supressão da atividade macrofágica. IL-10 atuaria deprimindo a secreção de IL-12, fator de crescimento para a população Th1 (Hsieh et al., 1993). Como demonstrado por Sieling et al. (1994), IL-12 está ausente nas lesões lepromatosas. IL-4 atuaria como fator adicional desta

atividade supressora pela indução da proliferação de novos clones de células CD8+ e estimulando, também, a produção de anticorpos (Salgame et al., 1991a) que estão associados à forma lepromatosa (Rojas-Espinosa, 1994). A associação das atividades destes mediadores celulares adicionada ao predomínio de células supressoras presentes nas lesões de virchowianos, proporcionaria a formação de um mecanismo supressivo desencadeado, provavelmente, pelo TGF- β 1.

Outro mecanismo que poderia estar contribuindo para a supressão observada nas lesões da forma lepromatosa, seria a ação do TGF- β 1 como potente quimiotático para mastócitos (Gruber et al., 1994), uma linhagem de células predominante nas lesões da forma LL (Aroni et al., 1993), que exibe sua atividade parcialmente supressora por liberar TGF- β (Hu et al., 1994), o que é relevante porque na presença de IL-4, mastócitos acumulados na lesão parecem capazes de se diferenciarem em células produtoras de IL-4 (Romagnani, 1992, citado por Caterino-de-Araújo, 1994), atuando como fator de manutenção do processo imunossupressor. Os mastócitos têm sido implicados também, como células efetoras potenciais no desenvolvimento de vários processos patológicos que envolvem fibrose (Gruber et al., 1994), provavelmente, por liberar TGF- β 1, potente estimulador da produção de proteínas da matriz extracelular (Roberts et al., 1992), em um mecanismo potencializador da presença de TGF- β 1 acentuando a formação de fibrose, como já demonstrado em doenças fibróticas (Border & Noble, 1994; Sfikakis et al., 1993; Gabrielli et al., 1993; Broekelmann et al., 1991; Kulozik et al., 1990; Czaja et al., 1989).

Sendo descrito que TGF- β 1 tem importante papel na inibição da liberação de citocinas tipo IL-1, TNF, TNF- β e IL-6 (Chantry et al., 1989; Bogdan et al., 1992; Suzumura et al., 1993), a baixa detecção destas citocinas nas lesões LL (Arnoldi et al., 1990; Flad et al., 1990) e em cultura de macrófagos de pacientes virchowianos ² (Silva & Foss, 1989; Barnes et al.,

² Comunicação pessoal - Prof^a Dr^a Norma T. Foss

1992), poderia ser explicada, pelo menos em parte, pela presença de TGF- β 1 nestas lesões, como mostram nossos resultados. Além disso, Ridell et al. (1983) demonstraram que o *M. leprae*, em cultura de macrófagos de pacientes lepromatosos, induziu altos níveis de síntese de prostaglandina-E₂ (PGE₂), que atua como um fator supressor de IL-1. PGE₂ é um mediador lipídico derivado de mastócitos (Abbas et al., 1994), sendo um achado adicional para a presença de mastócito nestas lesões (Aroni et al., 1994), justificando assim, a ação imunossupressora indireta do TGF- β 1, que atua como potente quimiotático para estas células (Gruber et al., 1994). Nas lesões virchowianas a ausência das citocinas IL-1 e TNF que têm papel importante na resposta inflamatória mediada por células, indica uma desativação das células fagocíticas mononucleares, pois ambas IL-1 e TNF são produzidas por macrófagos.

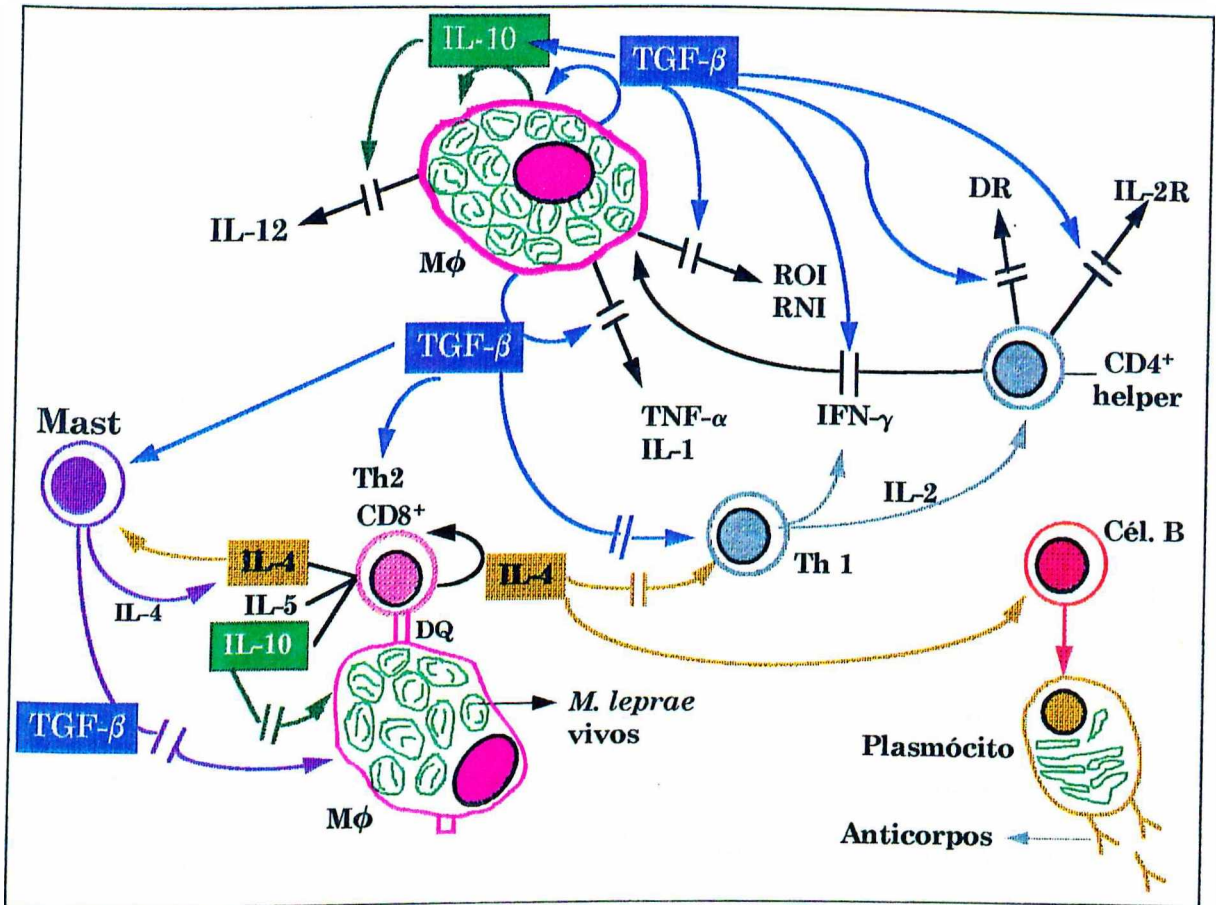
A presença de fatores supressores liberados pelos macrófagos de pacientes lepromatosos tem sido reportada desde 1983 por Salgame et al. Também Birdi et al. (1983), concluíram que "após a entrada do *M. leprae* no macrófago, inicia-se a produção de proteína(s) que atua via microtúbulos para alterar a topografia da membrana, evitando uma efetiva interação macrófago-linfócito, além de ser responsável pela amplificação do defeito em outros macrófagos". Estas interações supressoras, seriam mediadas por receptores celulares. Nossos resultados indicam que esta proteína poderia ser o TGF- β 1, desde que esta citocina é um polipeptídeo com efeitos sobre a forma da célula, regulando a produção de actina, principal proteína estrutural de microfilamentos celulares, que está envolvida em processos de morfogênese, motilidade e mitose (Leof et al., 1986). Corroborando esta hipótese, Reibman et al. (1991) demonstraram que o TGF- β 1 é um quimiotático potente para monócitos, elicitando a migração destas células através de sua ação na polimerização da actina.

Um dos fatores que levaria à supressão específica e precoce ao *M. leprae* no desenvolvimento da lesão da lepra lepromatosa poderia ser o TGF- β 1, um dos mais potentes inibidores endógenos da ação das linfocinas na ativação de macrófagos, inibindo a liberação de reativos intermediários do

oxigênio (ROI) e nitrogênio (RNI) (Tsunawaki et al., 1988; Ding et al., 1990; Bogdan & Nathan, 1993; Vodovotz et al., 1993; Stenger et al., 1994), os quais estão relacionados com a destruição intracelular de patógenos invasores (Nathan et al., 1979; Murray et al., 1979; Denis et al., 1991; Green et al., 1994), favorecendo conseqüentemente a progressão da infecção. IFN- γ , ao contrário, aumenta a produção desses radicais *in vitro* e *in vivo* (Murray et al., 1985; Nathan et al., 1983 e 1986).

Na forma lepromatosa há depressão da produção de IFN- γ no teste de linfoproliferação estimulado pelo *M. leprae* (Horwitz et al., 1984; Nogueira et al., 1983) e também nas lesões, onde há uma ausência de células com capacidade de expressar receptor de IL-2 (IL-2R) e antígenos HLA-DR que são marcadores de ativação celular associado ao IFN- γ (Volc-Platzer et al., 1988). A presença do TGF- β 1 nas lesões lepromatosas como evidenciaram nossos resultados, poderia explicar a ausência de células que expressam estes marcadores, através de sua ação inibitória sobre a indução de receptores de IL-2 (Fox et al., 1992) e a expressão de antígenos da classe II (Czarniecki et al., 1988) induzidas pelo IFN- γ . Paralelamente, seus efeitos supressores poderiam estar mediando a inibição da liberação de ROI em macrófagos de pacientes virchowianos (Holzer et al., 1986; Launois et al., 1989; Khare et al., 1993) e de ânions superóxido (O_2^-) em macrófagos humanos como demonstrado em experimentos com macrófagos pré-tratados com componentes do *M. leprae* (Neill & Klebanoff, 1988; Vachula et al., 1989; Vachula et al., 1990) (Esquema 13).

A atividade supressora do TGF- β 1 tem sido demonstrada em várias doenças causadas por parasitas intracelulares como *Leishmania* (Nelson et al., 1991; Barral-Netto et al., 1992; Barral et al., 1993; Barral-Netto & Barral, 1994; Stenger et al., 1994), *Toxoplasma gondii* (Bermudez et al., 1993), *Trypanosoma cruzi* (Silva et al., 1991), *Mycobacterium avium* (Bermudez et al., 1993) e o vírus da imunodeficiência humana (Lotz et al., 1993; Lazdins et al., 1991; Peterson et al., 1991).



Esquema 13. Forma virchowiana: presença de TGF-β1 e mecanismos de imunossupressão.

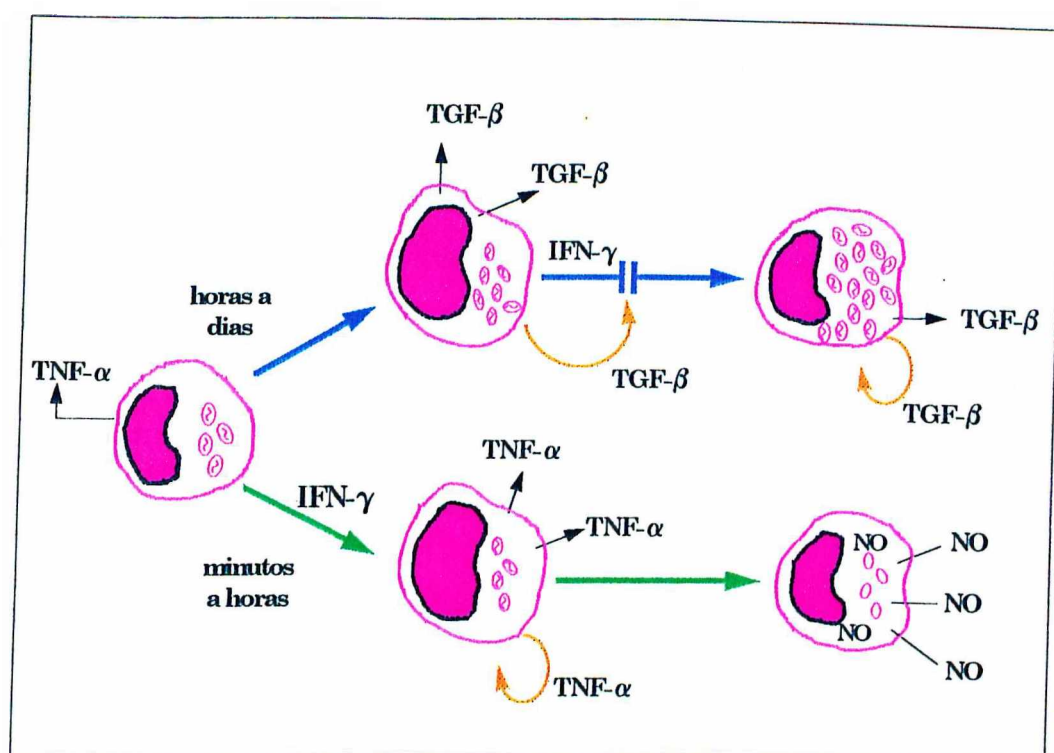
Assim, tem sido evidenciado que o TGF-β é fator preponderante na resposta do hospedeiro aos parasitas intracelulares, mantendo um intercâmbio entre a atividade do macrófago e esta citocina. Como nas lesões de virchowianos há proliferação de bacilos no interior do macrófago, e como já foi demonstrado por Sibley & Krahenbuhl (1987), em modelo experimental, que macrófagos de granulomas carregados com *M. leprae* são incapazes de produzir ânion superóxido (O_2^-), tornando-se consequentemente resistentes à ação ativadora do IFN-γ, pode-se fazer analogia com estes modelos de infecção por parasitas intracelulares, para explicar a atividade supressora do TGF-β1 na lesão da forma virchowiana.

Postula-se portanto, que esses patógenos intracelulares induziriam a produção dessa citocina TGF-β1, cuja presença no microambiente impediria

a atividade microbicida dos macrófagos estimulada por IFN- γ e/ou TNF- α e desta forma contribuiria para a perpetuação da infecção.

Os resultados do presente trabalho são consistentes com a hipótese de que esta citocina seria um importante fator envolvido nos mecanismos de escape do *M. leprae*. A presença de grande quantidade de bacilos nas lesões da hanseníase virchowiana, demonstra a incapacidade dos macrófagos em processar estes microorganismos. O aspecto morfológico destas células nas lesões sugere um estado de inatividade funcional e indiferenciação morfológica, o que contribuiria para a não formação da lesão granulomatosa e consequente falha dos mecanismos líticos, permitindo a sobrevivência do *M. leprae*. Embora o TGF- β latente possa ser produzido por macrófagos não infectados em cultura (Assoian et al., 1987), a demonstração de TGF- β ativo em sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados com *L. amazonensis* (Barral-Netto & Barral, 1994), *L. major* (Green et al., 1994) e *Mycobacterium avium* (Bermudez, 1993), pode ser bastante relevante para a infecção com o *Mycobacterium leprae*. É possível que o PGL-1, antígeno específico do *M. leprae*, possa induzir uma ativação semelhante do TGF- β , após sua entrada dentro do macrófago, podendo ser este o mediador provável da atividade inibitória específica do PGL-1 sobre a ativação macrofágica *in vitro* (Neill & Klebanoff, 1988; Vachula et al., 1989 e 1990; Silva et al., 1993), e também sobre a resposta mitogênica de linfócitos *in vitro* de pacientes com hanseníase (Mehra et al., 1984; Prasad et al., 1987).

De acordo com Green et al. (1994), *L. major* pode induzir a produção de duas citocinas competitivas por macrófagos infectados: TNF- α , a qual atuaria como um sinal autócrino para amplificar a produção de óxido nítrico (NO) induzida pelo IFN- γ , e TGF- β , a qual atuaria como um sinal autócrino para bloquear a produção de NO induzida pelo IFN- γ (Esquema 14). A presença de IFN- γ é que vai determinar qual citocina prevalecerá. Portanto, fica implícito que a exposição de macrófagos à citocina apropriada, no tempo apropriado são os requisitos para o “clearance” do parasita intracelular.

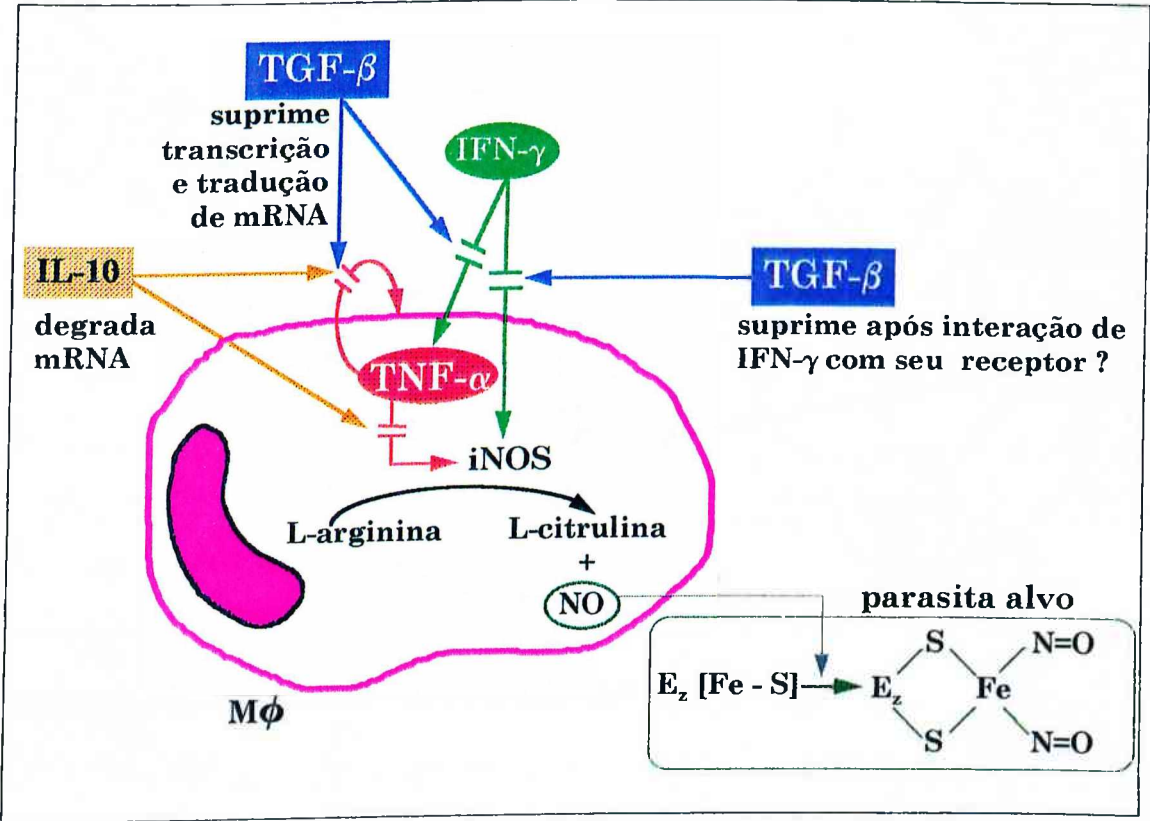


Esquema 14. Reproduzido de Green et al., 1994.

Com relação ao *M. leprae* infectando macrófagos, poder-se-ia supor que a indução precoce do $\text{TGF-}\beta 1$ é essencial para estabelecer o curso da infecção na ausência de $\text{IFN-}\gamma$, determinando a proliferação bacilar dentro do macrófago e esta proliferação descontrolada promoveria o desenvolvimento do padrão de resposta tipo Th2 que é observada na forma lepromatosa (Yamamura et al., 1991) com inibição da resposta Th1. Esta hipótese foi investigada em leishmaniose por Barral et al. (1993) que demonstraram que o $\text{TGF-}\beta$ é capaz de alterar o curso da infecção *in vitro* e *in vivo* com *L. braziliensis*, que foi posteriormente caracterizada por um aumento de IL-10, uma importante citocina de células Th2.

Muito dos efeitos imunoregulatórios do $\text{TGF-}\beta$ podem ser mediados indiretamente através de seus potentes efeitos sobre fenótipo e função de macrófagos (McCartney-Francis et al., 1990; Noble et al., 1993). Deste modo, em resposta à infecção pelo *M. leprae in vitro*, houve liberação de IL-10, produzido principalmente por macrófagos (Sieling et al., 1993). Esta citocina, IL-10, agiria de uma forma sinérgica com o $\text{TGF-}\beta$ suprimindo o próprio macrófago, em particular inibindo a produção de $\text{TNF-}\alpha$ e inibindo a

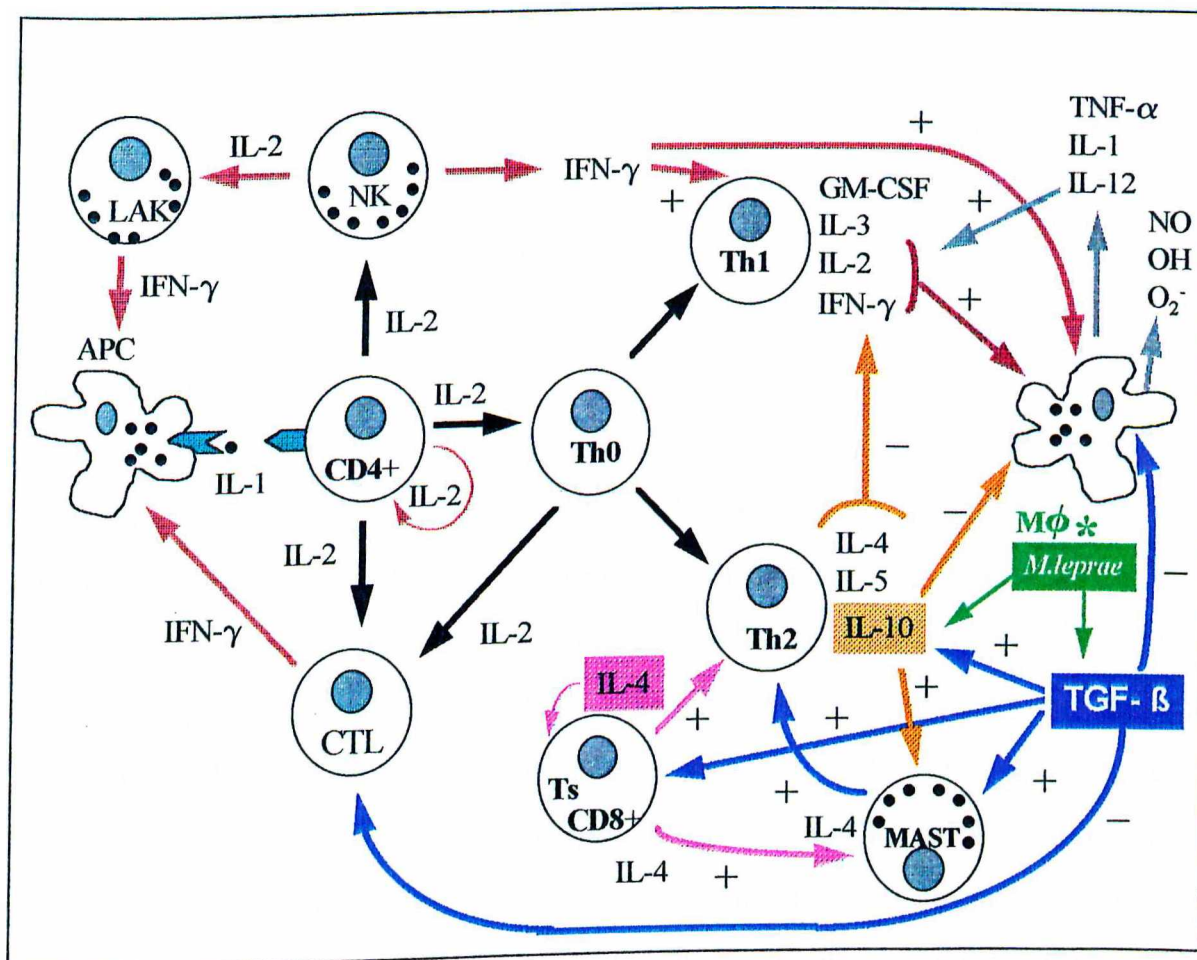
atividade antimicrobiana mediada pelo óxido nítrico (NO), além de suprimir diretamente a produção de sintase do óxido nítrico induzível (iNOS) pelo IFN- γ e/ou TNF- α (Stenger et al., 1994; Green et al., 1994; Sher et al., 1992; Nelson et al., 1991). Esta enzima, iNOS, oxida nitrogênio da L-arginina liberando NO, que atua inativando um complexo enzimático do parasita com núcleo Fe - S (ferro - enxofre), da cadeia transportadora de elétrons, formando o complexo Fe - nitrosil, impedindo a geração de energia (ATP) com morte do parasita (Esquema 15).



Esquema 15. Adaptado de Sher et al., 1992.

Assim, na lepra lepromatosa, na ausência de IFN- γ , o TGF- β 1 atuaria induzindo a liberação de IL-10, ambos produzidos por macrófagos que aparentemente agem conjuntamente com a IL-4, produzida por células TCD8+ e mastócitos também induzidas pelo TGF- β 1, num mecanismo imbricado de atividades sinérgicas, que resultaria na incapacidade das células CD4+ de construir uma resposta imune mediada por células. Estas ações supressoras da imunidade mediada por células como acima referido, inclui o bloqueio da

secreção de IL-12, um fator de crescimento altamente específico para a subpopulação Th1 (Hsieh et al., 1993), o que pode justificar seus baixos níveis em lesões lepromatosas (Sieling et al., 1994) (Esquema 16).



Esquema 16. Rede celular de resposta imune ao *M. leprae*.

É importante entender a dualidade das ações produzidas pelo *M. leprae* após sua entrada dentro dos macrófagos. O *Mycobacterium leprae* induz a produção de TNF- α (Sieling et al., 1993), IL-12 (Sieling et al., 1994), IL-10 (Sieling et al., 1993) e TGF- β 1 por macrófagos infectados. Estas são citocinas opostas em muitas formas de ação, incluindo suas ações sobre estas células. De um lado, o TNF- α promove a ativação de macrófagos para a destruição intracelular do *M. leprae* e potencializa os efeitos do IFN- γ , uma citocina produzida por células Th1, induzidas a proliferar na presença de IL-12, que também é produzida por este macrófago ativado na forma tuberculóide. Por

outro lado, o TGF- β e IL-10 desativam macrófagos, aumentam a proliferação bacilar e contrapõem os efeitos do TNF- α , IFN- γ e IL-12, com predomínio de resposta Th2, na forma virchowiana (Yamamura et al., 1991) (Esquema 16).

Na hanseníase é possível que a ativação da resposta Th1 e Th2 possam ocorrer em sequência (Rojas-Espinosa, 1994). Em modelo experimental com camundongos infectados com *M. lepraemurium*, as lesões granulomatosas de infecção precoce eram compostas de macrófagos ativados e linfócitos com padrão tipo granuloma tuberculóide. Em estágios posteriores da doença, as lesões adquiriram características do infiltrado lepromatoso (Rojas-Espinosa et al., 1988).

O destino da infecção pelo *M. leprae* em um hospedeiro, como o que ocorre pela *Leishmania* (Barral-Netto & Barral, 1994), parece depender de quando e como uma determinada citocina está disponível no sítio da presença do parasita, em maior quantidade em relação à vários outros produtos. Mais do que epítomos micobacterianos que poderiam estar participando na indução diferencial de cada subpopulação de células T, de acordo com Barral-Netto & Barral (1994), "a distinção entre os fatores que são fundamentais para determinar o destino do processo em um estágio inicial, a imunopatogênese, e aqueles que influenciam apenas o resultado final, a imunopatologia", é essencial. Neste contexto, um dos eventos iniciais seguintes à injúria tecidual, envolve a ativação de plaquetas para dentro do sítio inflamatório transportando TGF- β 1 em sua forma latente, que aí sofre ativação. Estas observações sugerem que o TGF- β 1, em sendo um produto precocemente sintetizado, com mecanismo próprio de autoregulação (McCartney-Francis et al., 1990; Noble et al., 1993) e sem a necessidade de um complexo circuito de imunoestimulação, poderia atuar precocemente em vários sítios modulando a rede de resposta imune inflamatória, como um elemento de imunopatogênese.

Estudos adicionais são necessários para esclarecer a biologia do TGF- β e a participação da diversidade fenotípica dos macrófagos envolvidos na produção desta molécula, na rede de células e mediadores que contribuem para a defesa do hospedeiro, incluindo os mecanismos controladores de seus

efeitos pró- ou anti-inflamatórios e sua atuação na imunopatologia das diferentes formas clínicas da hanseníase.

O entendimento de tais mecanismos de atuação do TGF- β , poderá oferecer novas abordagens para identificar seus agonistas e/ou antagonistas (Border et al., 1992) e em quais circunstâncias seu uso seria apropriado para intervenções imunológicas e/ou imunoterapêuticas.

Concluindo, os resultados desta investigação sugerem que o TGF- β 1 pode ter um importante papel orquestrando eventos iniciais (imunopatogênese) e evolução (imunopatologia) das diferentes formas clínicas de hanseníase.

RESUMO

Foram realizados estudos imunohistoquímicos para avaliar a presença e a distribuição do polipeptídeo TGF- β 1, citocina com atividade supressora sobre macrófagos, em biópsias de pele de 41 pacientes com diferentes formas clínicas de hanseníase. Neste estudo foi utilizado um anticorpo policlonal anti-TGF- β 1 e o método Avidina-Biotina-Peroxidase (Complexo- ABC).

Os resultados demonstram que as lesões das formas lepromatosa e borderline-lepromatosa apresentam intensa marcação para o TGF- β 1 nas células do infiltrado dérmico. A marcação das células dos granulomas dos casos borderline-borderline foi de intensidade moderada, enquanto no pólo tuberculóide e borderline-tuberculóide não houve imunorreação detectável nas células dos granulomas.

Considerando que no pólo lepromatoso da hanseníase o *M. leprae* multiplica-se no citoplasma dos macrófagos e as lesões são difusas e constituídas de células com indiferenciação morfológica e inatividade funcional, acreditamos que essas alterações poderiam ser explicadas, pelo menos em parte, pela presença do TGF- β 1 no infiltrado dérmico, contribuindo para a não formação de lesão granulomatosa e impedindo a atividade microbicida dos macrófagos. Sua produção poderia ser induzida pela própria presença do bacilo e seus constituintes, determinando um mecanismo de evasão do parasita na forma borderline-lepromatosa e lepromatosa.

Da mesma forma, a ausência de TGF- β 1 na hanseníase tuberculóide e borderline-tuberculóide, poderia explicar a exacerbação da resposta imune celular específica contra o *M. leprae*, determinando intensa diferenciação das células macrofágicas com formação de granulomas epitelióides bem definidos, capazes de eliminar a grande maioria dos bacilos.

SUMMARY

Immunohistochemical studies were performed to determine the presence and distribution of the polypeptide TGF- β 1, a cytokine with macrophage suppressing activity, in skin biopsies from 41 patients with different clinical forms of leprosy. It was used an anti-TGF- β 1 polyclonal antibody and the avidin-biotin-peroxidase (ABC-Complex) method.

The results demonstrated that the lesions of the lepromatous and borderline-lepromatous forms presented intense cytoplasm staining for TGF- β 1 in the cells of the dermal infiltrate. The reaction in the cells of granulomas from borderline cases was of moderate intensity, whereas in the tuberculoid and borderline-tuberculoid forms there was no detectable immunoreaction in granuloma cells.

Considering that in the lepromatous leprosy form *M. leprae* multiplies in the cytoplasm of macrophages and the lesions are diffuse and consisted of cell with no morphological differentiation cells and functional inactivity, we believed that these alterations may be explained at least in part by the presence of TGF- β 1 in the dermal infiltrate, contributing to the no granulomatous lesion formation, and blocking the microbicidal activity. Production of the cytokine may be induced by the presence of the bacillus itself and of its constituents, causing a mechanism of parasite evasion.

Similarly, the absence of TGF- β 1 in tuberculoid and borderline-tuberculoid leprosy may explain the exacerbation of the specific immune response to the *M. leprae*, determining the intense differentiation of macrophage cells with the formation of well defined epitheloid granulomas capable of eliminating most of the bacilli.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H., POBER, J.S. **Cellular and Molecular Immunology**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1994. 457p.
- ARNOLDI, J., GERDES, J., FLAD, H.-D. Immunohistologic assessment of cytokine production of infiltrating cells in various forms of leprosy. **Am. J. Pathol.**, v.137, n.4, p.749-753, 1990.
- ARONI, K., KONTOCHRISTOPOULOS, G., LIOSSI, A., PANTELEOS, D. An investigation of mast cells in two basic leprosy groups. **Int. J. Lepr.**, v.61, n.4, p.634-635, 1993.
- ARTEAGA, C.L., HURD, S.D., WINNIER, A.R., JOHNSON, M.D., FENDLY, B.M., FORBES, J.T. Anti-transforming growth factor (TGF)- β antibodies inhibit breast cancer cell tumorigenicity and increase mouse spleen natural killer cell activity. **J. Clin. Invest.**, v.92, p.2569-2576, 1993.
- ASSOIAN, R.K., FLEURDELYS, B.E., STEVENSON, H.C., MILLER, P.J., MADTES, D.K., RAINES, E.W., ROSS, R., SPORN, M.B. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.84, p.6020-6024, 1987.
- BARNES, P.F., CHATTERJEE, D., BRENNAN, P.J., REA, T.H., MODLIN, R.L. Tumor necrosis factor production in patients with leprosy. **Infect. Immun.**, v.60, n.4, p.1441-1446, 1992.
- BARNETSON, R.S., BJUNE, G., PEARSON, J.M.H., KRONVALL, G. Cell mediated and humoral immunity in "reversal reactions". **Int. J. Lepr.**, v. 44, n.1/2, p.267-274, 1976.

- BARNUM, S.R., JONES, L.J. Transforming growth factor- β 1 inhibits inflammatory cytokine-induced C3 gene expression in astrocytes. **J. Immunol.**, v.152, p.765-773, 1994.
- BARRAL, A., BARRAL-NETTO, M., YONG, E.C., BROWNELL, C.E., TWARDZIK, D.R., REED, S.G. Transforming growth factor β as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.3442-3446, 1993.
- BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A. Transforming growth factor- β in tegumentary leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.27, p.1-9, 1994.
- BARRAL-NETTO, M., BARRAL, A., BROWNELL, C.E., SKEIKY, Y.A.W., ELLINGSWORTH, L.R., TWARDZIK, D.R., REED, S.G. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science**, v.257, p.545-548, 1992.
- BASSOLS, A., MASSAGUÉ, J. Transforming growth factor β regulates the expression and structure of extracellular matrix chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.6, p.3039-3045, 1988.
- BERMUDEZ, L.E. Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . **J. Immunol.**, v.150, n.5, p.1838-1845, 1993.
- BERMUDEZ, L.E., COVARO, G., REMINGTON, J. Infection of murine macrophages with *Toxoplasma gondii* is associated with release of transforming growth factor β and downregulation of expression of tumor necrosis factor receptors. **Infect. Immun.**, v.61, n.10, p.4126-4130, 1993.

- BIRDI, T.J., MISTRY, N.F., MAHADEVAN, P.R., ANTIA, N.H. Alterations in the membrane of macrophages from leprosy patients. **Infect. Immun.**, v. 41, n.1, p.121-127, 1983.
- BJORVATN, B., BARNETSON, R.S., KRONVALL, G., ZUBLER, R.H., LAMBERT, P.H. Immune complexes and complement hypercatabolism in patients with leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.26, p.388-396, 1976.
- BLOOM, B.R. Learning from leprosy: a perspective on immunology and the third world. **J. Immunol.**, v.137, n.1, p.1-10, 1986.
- BLOOM, B.R., MEHRA, V. Immunological unresponsiveness in leprosy. **Immun. Rev.**, n.80, p.5-28, 1984.
- BLOOM, R., SALGAME, P., DIAMOND, B. Revisiting and revising suppressor T cells. **Immunol. Today**, v.13, n.4, p.131-136, 1992.
- BOGDAN, C., NATHAN, C. Modulation of macrophage function by transforming growth factor- β , interleukin-4, and interleukin-10. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.685, p.713-739, 1993.
- BOGDAN, C., PAIK, J., VODOVOTZ, Y., NATHAN, C. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor- β and interleukin-10. **J. Biol. Chem.**, v.267, n.32, p.23301-23308, 1992.
- BORDER, W.A., NOBLE, N.A. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. **N. Engl. J. Med.**, v.331, n.19, p.1286-1292, 1994.
- BORDER, W.A., NOBLE, N.A., YAMAMOTO, T., TOMOOKA, S., KAGAMI, S. Antagonists of transforming growth factor- β : a novel approach

to treatment of glomerulonephritis and prevention of glomerulosclerosis. **Kidney Int.**, v.41, p.566-570, 1992.

BORDER, W.A., OKUDA, S., LANGUINO, L.R., RUOSLAHTI, E. Transforming growth factor- β regulates production of proteoglycans by mesangial cells. **Kidney Int.**, v.37, p.689-695, 1990b.

BORDER, W.A., OKUDA, S., LANGUINO, L.R., SPORN, M.B., RUOSLAHTI, E. Suppression of experimental glomerulonephritis by antiserum against transforming growth factor- β 1. **Nature**, v.346, n.6282, p.371-374, 1990a.

BRITTON, W.J. Leprosy 1962-1992. Immunology of leprosy. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.87, p.508-514, 1993.

BROEKELMANN, T.J., LIMPER, A.H., COLBY, T.V., MCDONALD, J.A. Transforming growth factor β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.6642-6646, 1991.

CATERINO-DE-ARAÚJO, A. The CD4⁺ T-cell network and the cytokine profile after HIV-1 infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.28, p.2-6, 1994.

CHAN, J., XING, Y., MAGLIOZZO, R.S., BLOOM, B.R. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. **J. Exp. Med.**, v.175, p.1111-1122, 1992.

CHANTRY, D., TURNER, M., ABNEY, E., FELDMANN, M. Modulation of cytokine production by transforming growth factor- β **J. Immunol.**, v.142, n.12, p.4295-4300, 1989.

- CHER, D.J., MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J. Immunol.**, v.138, p.3688-3694, 1987.
- COIMBRA, T., WIGGINS, R., NOH, J.W., MERRITT, S., PHAN, S.H. Transforming growth factor- β production in anti-glomerular basement membrane disease in the rabbit. **Am. J. Pathol.**, v.138, n.1, p.223-234, 1991.
- COLLINGS, L.A., WATERS, M.F., POULTER, L.W. The involvement of dendritic cells in the cutaneous lesions associated with tuberculoid and lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 62, p.458-467, 1985.
- COORDENAÇÃO NACIONAL DE DERMATOLOGIA SANITÁRIA/ CENTRO NACIONAL DE EPIDEMIOLOGIA/ FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Guia de controle da hanseníase**. Ministério da Saúde-Brasil. 2ª ed., Brasília, 1994. 156p.
- CORRIGAN, C.J., KAY, A.B. T cells and eosinophils in the pathogenesis of asthma. **Immunol. Today**, v.13, p.501-507, 1992.
- CZARNIECKI, C.W., CHIU, H.H., WONG, G.H.W., MCCABE, S.M., PALLADINO, M.A. Transforming growth factor- β 1 modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. **J. Immunol.**, v.140, p.4217-4223, 1988.
- CZAJA, M.J., WEINER, F.R., FLANDERS, K.C., GIAMBRONE, M.A., WIND, R., BIEMPICA, L., ZERN, M.A. *In vitro* and *in vivo* association of transforming growth factor- β 1 with hepatic fibrosis. **J. Cell. Biol.**, v.108, p.2477-2482, 1989.

- DENIS, M. Interferon-gamma treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive intermediates. **Cell. Immunol.**, v.132, p.150-157, 1991.
- DERYNCK, R., JARRET, J.A., CHEN, E.Y., EATON, D.H., BELL, J.R., ASSOIAN, R.K., ROBERTS, A.B., SPORN, M.B., GOEDDEL, D.V. Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. **Nature**, v.316, p.701-705, 1985.
- DE VRIES, R.R. Genetic control of immunopathology induced by *Mycobacterium leprae*. **Am. J. Trop. Hyg.**, v.44, p.12-16, 1991.
- DING, A., NATHAN, C.F., GRAYCAR, J., DERYNCK, R., STUEHR, D., SRIMAL, S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- β 1, - β 2, and - β 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . **J. Immunol.**, v.145, n.3, p.940-944, 1990.
- DRUTZ, D.J., GUTMAN, R.A. Renal manifestations of leprosy: glomerulonephritis, a complication of *erythema nodosum leprosum*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.22, p.496-502, 1973.
- FLAD, H.-D., ARNOLDI, J., OHLERT, A., KAZDA, J., GERDES, J. Cytokine production and proliferative capacity of infiltrating cells in various forms of leprosy. **Trop. Med. Parasitol.**, v.41, p.307-309, 1990.
- FLEURY, R.N. Dificuldades no emprego da classificação de Ridley e Jopling - Uma análise morfológica. **Hansen. Int.** v.14, n.2, p.101-106, 1989.
- FOX, F.E., CAPOCASALE, R.J., FORD, H.C., LAMB, R.J., MOORE, J.S., NOWELL, P.C. Transforming growth factor- β inhibits human T-cell

proliferation through multiple targets. **Lymphok. Cytok. Res.**, v.11, n.6, p.299-305, 1992

GABRIELLI, A., DI LORETO, C., TABORRO, R., CANDELA, M., SAMBO, P., NITTI, C., DANIELI, M.G., DE LUSTRO, F., DASCH, J.R., DANIELI, G. Immunohistochemical localization of intracellular and extracellular associated TGF- β in the skin of patients with systemic sclerosis (Scleroderma) and primary Raynaud's phenomenon. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.68, n.3, p.340-349, 1993.

GAMBLE, J.R., VADAS, M.A. Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor- β . **Science**, v.242, p.97-99, 1988.

GAMBLE, J.R., VADAS, M.A. Endothelial cell adhesiveness for human T lymphocytes is inhibited by transforming growth factor- β . **J. Immunol.**, v.146, p.1149-1154, 1991.

GAYLORD, H., BRENNAN, P.J. Leprosy: Antigens and Host-Parasite Interactions. In: PEARSON, T.W. **Parasite Antigens. Toward New Strategies for Vaccines**. New York: Marcel Dekker Inc., 1986. p.49-89.

GILBERT, R.S., HERSCHMAN, H.R. Transforming growth factor beta differentially modulates the inducible nitric oxide synthase gene in distinct cell types. **Bioch. Bioph. Res.**, v.195, n.1, p.380-384, 1993.

GODAL, T., MYRVANG, B., SAMUEL, D.R., ROSS, W.F., LOFGREN, M. Mechanism of "reactions" in borderline tuberculoid (BT) leprosy. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, v.236, p.45-53, 1973. Suppl.

GREEN, S.J., SCHELLER, L.F., MARLETTA, M.A., SEGUIN, M.C., KLOTZ, F.W., SLAYTER, M., NELSON, B.J., NACY, C.A. Nitric oxide:

cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. **Immunol. Lett.**, v.43, p.87-94, 1994.

GRUBER, B.L., MARCHESE, M.J., KEW, R.R. Transforming growth factor- β 1 mediates mast cell chemotaxis. **J. Immunol.**, v.152, p.5860-5867, 1994.

HARBOE, M. The Immunology of leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**. New York: Churchill Livingstone Inc., 1985. p. 53-87 (Medicine in the Tropics).

HEINZEL, F.P., SADICK, M.D., HOLADAY, B.J., COFFMAN, R.L., LOCKSLEY, R.M. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. **J. Exp. Med.**, v. 169, p.59-72, 1989.

HOLZER, T.J., NELSON, K.E., SCHAUF, V., CRISPEN, R.G., ANDERSEN, B.R. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. **Infect. Immun.**, v.51, p.514-520, 1986.

HORWITZ, M.A., LEVIS, W.R., COHN, Z.A. Defective production of monocyte activating cytokines in lepromatous leprosy. **J. Exp. Med.**, v.159, p.666-678, 1984.

HSIEH, C.S., MACATONIA, S.E., TRIPP, C.S., WOLF, S.F., O'GARRA, A., MURPHY, K.M. Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**, v.260, p.547-549, 1993.

- HU, Z.-Q., YAMAZAKI, T., CAI, Z., YOSHIDA, T., SHIMAMURA, T. Mast cells display natural suppressor activity partially by releasing transforming growth factor- β . **Immunol.**, v.82, p.482-486, 1994.
- ISAKA, Y., FUJIWARA, Y., UEDA, N., KANEDA, Y., KAMADA, T., IMAI, E. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- β or platelet-derived growth factor gene into the rat kidney. **J. Clin. Invest.**, v.92, p.2597-2601, 1993.
- IYER, R.R., PRASAD, H.K., BHUTANI, L.K., RAO, D.N. Effect of tuftsin stimulation on the microbicidal activity exerted by blood monocyte-macrophage of leprosy patients. **Int. J. Immunopharmac.**, v.12, n.8, p.859-869, 1990b.
- IYER, R.R., PRASAD, H.K., BHUTANI, L.K., RAO, D.N. Modulation of human lepromatous monocyte-macrophage functions *in vitro* by tuftsin. **Int. J. Immunopharmac.**, v.12, n.8, p.847-858, 1990a.
- KALEAB, B., KIESSLING, R., VAN EMBDEN, J.D.A., THOLE, J.E.R., KUMARARATNE, S., PISA, P., WONDIMU, A., OTTENHOFF, T.H.M. Induction of antigen-specific CD4⁺ HLA-DR-restricted cytotoxic T lymphocytes as well as nonspecific nonrestricted killer cells by the recombinant mycobacterial 65-kDa heat-shock protein. **Eur. J. Immunol.**, v.20, p.369-377, 1990a.
- KALEAB, B., OTTENHOFF, T.H.M., CONVERSE, P., HALAPI, E., TADESSE, G., ROTTENBERG, M., KIESSLING, R. Mycobacterial-induced cytotoxic T cells as well as nonspecific killer cells derived from healthy individuals and leprosy patients. **Eur. J. Immunol.**, v.20, p.2651-2659, 1990b.

- KAPLAN, G., NUSRAT, A., WITMER, M.D., NATH, I., COHN, Z.A. Distribution and turnover of Langerhans cells during delayed immune responses in human skin. **J. Exp. Med.**, v.165, p.763-776, 1987.
- KEHRL, J.H., ROBERTS, A.B., WAKEFIELD, L.M., JAKOWLEW, S., SPORN, M.B., FAUCI, A.S. Transforming growth factor- β is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. **J. Immunol.**, v.137, n.12, p.3855-3860, 1986.
- KEHRL, J.H., TAYLOR, A., KIM, S-J., FAUCI, A.S. Transforming growth factor-beta is a potent negative regulator of human lymphocytes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v.628, p.345-353, 1991.
- KHARE, S., BHUTANI, L.K., RAO, D.N. Modulation of peripheral blood derived monocytes/macrophages from leprosy patients using "tuftsin" for production of reactive oxygen intermediates. **Lepr. Rev.**, v.64, p.208-218, 1993.
- KOHLI, M., VAISHNAVI, C., JASWAL, S., KAUR, S., GANGULY, N.K. Respiratory burst metabolic status of macrophages in experimental leprosy. **J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.**, v.36, n.2, p.201-206, 1992.
- KULKARNI, A.B., HUH, C-G., BECKER, D., GEISER, A., LYGH, M., FLANDERS, K.C., ROBERTS, A.B., SPORN, M.B., WARD, J.M., KARLSSON, S. Transforming growth factor β 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.90, p.770-774, 1993.
- KULOZIK, M., HOGG, A., LANKAT-BUTTGEREIT, B., KRIEG, T. Co-localization of transforming growth factor β 2 with α 1 (I) procollagen mRNA

in tissue sections of patients with systemic sclerosis. **J. Clin. Invest.**, v.86, p.917-922, 1990.

LAUNOIS, P., MAILLÈRE, B., DIEYE, A., SARTHOU, J.L., BACH, M.-A.
Human phagocyte oxidative burst activation by BCG, *Mycobacterium leprae*
and atypical mycobacteria; defective activation by *Mycobacterium leprae* is
not reversed by interferon-gamma. **Cell. Immunol.**, v.124, p.168-174, 1989.

LAZDINS, J.K., KLIMKAIT, T., WOODS-COOK, K., WALKER, M.,
ALTERY, E., COX, D., CERLETTI, N., SHIPMAN, R., BILBE, G.,
MCMASTER, G. *In vitro* effect of transforming growth factor- β on
progression of HIV-1 infection in primary mononuclear phagocytes. **J.**
Immunol., v.147, n.4, 1201-1207, 1991.

LEE, H-M., RICH, S. Differential activation of CD8⁺ T cells by transforming
growth factor- β 1. **J. Immunol.**, v.151, n.2, p.668-677, 1993.

LEOF, E.B., PROPER, J.A., GETZ, M.J., MOSES, H.L. Transforming growth
factor type β regulation of actin mRNA. **J. Cell. Physiol.**, v.127, p.83-88,
1986.

LETTERIO, J.J., GEISER, A.G., KULKARNI, A.B., ROCHE, N.S., SPORN,
M.B., ROBERTS, A.B. Maternal rescue of transforming growth factor- β 1
null mice. **Science**, v.264, p.1936-1938, 1994.

LONGLEY, J., HAREGEWOIN, A., YEMANEBERHAN, T., VAN DIEPEN,
T.W., NSIBAMI, J., KNOWLES, D., SMITH, K.A., GODAL, T. *In vivo*
responses to *Mycobacterium leprae*: antigen presentation, interleukin-2
production, and immune cell phenotypes in naturally occurring leprosy
lesion. **Int. J. Lepr.**, v. 53, n.3, p.385-394, 1985.

- LOTZ, M., SETH, P. TGF- β and HIV infection. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.685, p.501-511, 1993.
- MCCARTNEY-FRANCIS, N., MIZEL, D., WONG, H., WAHL, L., WAHL, S. TGF- β regulates production of growth factors and TGF- β by human peripheral blood monocytes. **Growth Factors**, v.4, p.27-35, 1990.
- MEHRA, V., BRENNAN, P.J., RADA, E., CONVIT, J., BLOOM, B.R. Lymphocyte suppression in leprosy induced by unique *M. leprae* glycolipid. **Nature**, v.308, p.194-196, 1984.
- MEHRA, V., CONVIT, J., RUBINSTEIN, A., BLOOM, B.R. Activated suppressor T cells in leprosy. **J. Immunol.**, v.129, n.5, p.1946-1951, 1982.
- MEHRA, V., MASON, L.H., FIELDS, J.P. and BLOOM, B.R. Lepromin-induced suppressor cells in patients with leprosy. **J. Immunol.**, v.123, n.4, p.1813-1817, 1979.
- MILLER, A., AL-SABBAGH, A., SANTOS, L.M.B., DAS, M.P., WEINER, H.L. Epitopes of myelin basic protein that trigger TGF- β release after oral tolerization are distinct from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. **J. Immunol.**, v.151, n.12, p.7307-7315, 1993.
- MISTRY, N.F., BIRDI, T.J., MAHADEVAN, P.R., ANTIA, N.H. *Mycobacterium leprae* - induced alterations in macrophage Fc receptor expression and monocyte-lymphocyte interaction in familial contacts of leprosy patients. **Scand. J. Immunol.**, v.22, p.415-423, 1985.
- MIYAZONO, K., HELDIN, C.H. Role for carbohydrate structures in TGF- β 1 latency. **Nature**, v.338, p.158-160, 1989.

- MIYAZONO, K., HELLMAN, U., WERNSTEDT, C., HELDIN, C.H. Latent high molecular weight complex of transforming growth factor β 1. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.13, p.6407-6415, 1988.
- MODLIN, R.L., BLOOM, B.R. Immune regulation: learning from leprosy. **Hosp. Pract.**, v.28, n.11, p.71-84, 1993.
- MODLIN, R.L., GEBHARD, J.F., TAYLOR, C.R., REA, T.H. *In situ* characterization of T lymphocyte subsets in the reactional states of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.53, p.17-24, 1983b.
- MODLIN, R.L., HOFMAN, F.M., HORWITZ, D.A., HUSMANN, L.A., GILLIS, S., TAYLOR, C.R., REA, T.H. *In situ* identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. **J. Immunol.**, v.132, n.6, p.3085-3090, 1984.
- MODLIN, R.L., HOFMAN, F.M., MEYER, P.R., SHARMA, O.P., TAYLOR, C.R., REA, T.H. *In situ* demonstration of T lymphocyte subsets in granulomatous inflammation: leprosy, rhinoscleroma and sarcoidosis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.51, p.430-438, 1983c.
- MODLIN, R.L., HOFMAN, F.M., TAYLOR, C.R., REA, T.H. T lymphocyte subsets in the skin lesion of patients with leprosy. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.8, p.182-189, 1983a.
- MODLIN, R.L., KATO, H., MEHRA, V., NELSON, E.E., XUE-DONG, F., REA, T.H., PATTENGAL, P.K., BLOOM, B.R. Genetically restricted suppressor T-cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. **Nature**, v.322, p.459-461, 1986c.

- MODLIN, R.L., MEHRA, V., JORDAN, R., BLOOM, B.R., REA, T.H. *In situ* and *in vitro* characterization of the cellular immune response in *erythema nodosum leprosum*. **J. Immunol.**, v. 136, n.3, p.883-886, 1986b.
- MODLIN, R.L., MEHRA, V., WONG, L., FUJIMIYA, Y., CHANG, W-C, HORWITZ, D.A., BLOOM, B.R., REA, T.H., PATTENGAL, P.K. Suppressor T lymphocytes from lepromatous leprosy skin lesions. **J. Immunol.**, v.137, n.9, p.2831-2834, 1986a.
- MODLIN, R.L., MELANCON-KAPLAN, J., YOUNG, S.M.M., PIRMEZ, C., KINO, H., CONVIT J., REA, T.H., BLOOM, B.R. Learning from lesions: patterns of tissue inflammation in leprosy. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 85, p.1213-1217, 1988.
- MODLIN, R.L., REA, T.H. Leprosy: New insight into an ancient disease. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.17, n.1, p.1-13, 1987.
- MORAN, C.J., TURK, J.L., RYDER, G., WATERS, M.F.R. Evidence for circulating immune complexes in lepromatous leprosy. **Lancet**, v.2, n.777, p.572-573, 1972.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v.136, n.7, p.2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T.R., MOORE, K.W. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. **Immunoparasitol. Today**, Cambridge, p.A49-A53, 1991.

- MULÉ, J.J., SCHWARZ, S.L., ROBERTS, A.B., SPORN, M.B., ROSENBERG, S.A. Transforming growth factor-beta inhibits the *in vitro* generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells. **Cancer Immunol. Immunother.**, v. 26, p.95-100, 1988.
- MURRAY, H.W., COHN, Z.A. Macrophage oxygen-dependent antimicrobial activity. I. Susceptibility of *Toxoplasma gondii* to oxygen intermediates. **J. Exp. Med.**, v.150, p.938-939, 1979.
- MURRAY, H.W., SPITALNY, G.L., NATHAN, C.F. Activation of mouse peritoneal macrophages *in vitro* and *in vivo* by interferon-gamma. **J. Immunol.**, v.134, p.1619-1622, 1985.
- NARAYANAN, R.B., BHUTANI, L.K., SHARMA, A.K., NATH, I. Normal numbers of T₆ positive epidermal Langerhans cells across the leprosy spectrum. **Lepr. Rev.**, v.55, p.301-308, 1984b.
- NARAYANAN, R.B., BHUTANI, L.K., SHARMA, A.K., NATH, I. T cell subsets in leprosy lesions: *in situ* characterization using monoclonal antibodies. **Clin. Exp. Immunol.**, v.51, p.421-429, 1983.
- NARAYANAN, R.B., LAAL, S., SHARMA, A.K., BHUTANI, L.K., NATH, I. Differences in predominant T cell phenotypes and distribution pattern in reactional lesions of tuberculoid and lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.55, p.623-628, 1984a.
- NATH, I., VAN ROOD, J.J., MEHRA, N.K., VAIDYA, M.C. Natural suppressor cells in human leprosy: the role of HLA-D- identical peripheral lymphocytes and macrophages in the *in vitro* modulation of lymphoproliferative responses. **Clin. Exp. Immunol.**, v.42, p.203-210, 1980.

- NATHAN, C.F., KAPLAN, G., LEVIS, W.R., NUSRAT, A., WITMER, M.O., SHERWIN, S.A., JOB, C.K., HOROWITZ, C.R., STEINMAN, R.M., COHN, Z.A. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon-gamma in patients with lepromatous leprosy. **N. Engl. J. Med.**, v.315, p.6-15, 1986.
- NATHAN, C.F., MURRAY, H.W., WIEBE, M.E., RUBIN, B.Y. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. **J. Exp. Med.**, v.158, p.670-689, 1983.
- NATHAN, C.F., NOGUEIRA, N., JUANGBHANICH, C., ELLIS, J., COHN, Z.A. Activation of macrophages in vivo and in vitro: correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, v.149, p.1056-1068, 1979.
- NEILL, M.A., KLEBANOFF, S.J. The effect of phenolic glycolipid-I from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. **J. Exp. Med.**, v.167, p.30-42, 1988.
- NELSON, B.J., RALPH, P., GREEN, S.J., NACY, C.A. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta1. **J. Immunol.**, v.146, p.1849-1857, 1991.
- NOBLE, P.W., HENSON, P.M., LUCAS, C., MORA-WORMS, M., CARRÉ, P.C., RICHES, D.W.H. Transforming growth factor- β primes macrophages to express inflammatory gene products in response to particulate stimuli by an autocrine/paracrine mechanism. **J. Immunol.**, v.151, n.2, p.979-989, 1993.

- NOGUEIRA, N., KAPLAN, G., LEVY, E., SARNO, E.N., GRANELI-PIPERNO, A., VIEIRA, L., GOULD, V., LEVIS, W., STEINMAN, R., YIP, Y.K., COHN, Z.A. Defective gamma-interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin-2. **J. Exp. Med.**, v.158, p.2165-2170, 1983.
- OLMSTED, J.B. Analysis of cytoskeletal structures using blot-purified monospecific antibodies. **Meth. Enzymol.**, v.134, p.467-472, 1986.
- OTTENHOFF, T.H.M. Immunology of leprosy: lessons from and for leprosy. **Int. J. Lepr.**, v.62, n.1, p.108-121, 1994.
- PETERSON, P. K., GEKKER, G., CHAO, C.C., SCHUT, R., MOLITOR, T.W., BALFOUR Jr., H.H. Cocaine potentiates HIV-1 replication in human peripheral blood mononuclear cell cocultures. **J. Immunol.**, v.146, p.81-84, 1991.
- PFALTZGRAFF, R.E., BRYCESON, A. Clinical Leprosy. In: HASTINGS, R.C. **Leprosy**. New York: Churchill Livingstone Inc., 1985. p.134-176.
- PRASAD, H.K., MISHRA, R.S., NATH, I. Phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* induces general suppression of *in vitro* concanavalin A responses unrelated to leprosy type. **J. Exp. Med.**, v.165, p.239-244, 1987.
- RAPPOLEE, D.A., MARK, D., BANDA, M.J., WERB, Z. Wound macrophages express TGF- β and other growth factors *in vivo*: analysis by mRNA phenotyping. **Science**, v.241, p.708-712, 1988.

RAPPOLEE, D.A., WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, v.1, p.47-55, 1988.

REA, T.H., SHEN, J.Y., MODLIN, R.L. Epidermal keratinocyte Ia expression, Langerhans cell hyperplasia and lymphocytic infiltration in skin lesions of leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.65, p.253-259, 1986.

REIBMAN, J., MEIXLER, S., LEE, T.C., GOLD, L.I., CRONSTEIN, B.N., HAINES, K.A., KOLASINSKI, S.L., WEISSMANN, G. Transforming growth factor β 1, a potent chemoattractant for human neutrophils, bypasses classic signal-transduction pathways. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.88, p.6805-6809, 1991.

RIDEL, P.R., JAMET, P., ROBIN, Y., BACH, M.A. Interleukin-1 released by blood-monocyte-derived macrophages from patients with leprosy. **Infect. Immun.**, v.52, n.1, p.303-308, 1986.

RIDLEY, D.S. Skin biopsy in leprosy. **Documenta Geigy**, 3rd edition. CIBA-GEIGY Limited. Basle, Switzerland. 1990. 63p.

RIDLEY, D.S., JOPLING, W.H. Classification of Leprosy According to Immunity. A Five-group System. **Int. J. Lepr.**, v.34, p.255-273, 1966.

ROBERTS, A.B., MCCUNE, B.K., SPORN, M.B. TGF- β : regulation of extracellular matrix. **Kidney Int.**, v.41, p.557-559, 1992.

ROBERTS, A.B., SPORN, M.B. Transforming growth factor β . **Adv. Cancer Res.**, v.51, p.107-145, 1988.

ROBERTS, A.B., SPORN, M.B., ASSOIAN, R.K., SMITH, J.M., ROCHE, N.S., WAKEFIELD, L.M., HEINE, U.I., LIOTTA, L.A., FALANGA, V.,

- KEHRL, J.H., FAUCI, A.S. Transforming growth factor type- β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis *in vivo* and stimulation of collagen formation *in vitro*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v.83, p.4167-4171, 1986.
- ROJAS-ESPINOSA, O. Active humoral immunity in the absence of cell-mediated immunity in murine leprosy: lastly an explanation. **Int. J. Lepr.**, v.62, n.1, p.143-147, 1994.
- ROJAS-ESPINOSA, O., MENDES-NAVARRETE, I., ESTRADA-PARRA, S. Presence of C1q-reactive immune complexes in patients with leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.12, n.2, p.215-223, 1972.
- SALGAME, P., ABRAMS, J.S., CLAYBERGER, C., GOLDSTEIN, H., CONVIT, J., MODLIN, R.L., BLOOM, B.R. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 cell clones. **Science**, v.254, p.279-282, 1991a.
- SALGAME, P., CONVIT, J., BLOOM, B.R. Immunological suppression by human CD8⁺T cells is receptor dependent and HLA-DQ restricted. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.88, p.2598-2602, 1991b.
- SALGAME, P.R., MAHADEVAN, P.R., ANTIA, N.H. Mechanism of immunosuppression in leprosy: presence of suppressor factor(s) from macrophages of lepromatous patients. **Infect. Immun.**, v.40, n.3, p.1119-1126, 1983.
- SASIAIN, M.C., BARRERA, S., MINNUCCI, F., VALDEZ, R., BRACCO, M.M.E., BALIÑA, L.M. T-cell-mediated cytotoxicity against *Mycobacterium* antigen-pulsed autologous macrophages in leprosy patients. **Infect. Immun.**, v.60, n.8, p.3389-3395, 1992.

SCHMID, P., COX, D., BILBE, G., MCMASTER, G., MORRISON, C., STÄHELIN, H., LÜSCHER, N., SEILER, W. TGF- β s and TGF- β type II receptor in human epidermis: differential expression in acute and chronic skin wounds. **J. Pathol.**, v.171, p.191-197, 1993.

SENGUPTA, U. Cell-mediated immunity in leprosy: an update. **Int. J. Lepr.**, v.61, n.3, p.439-454, 1993.

SCOLLARD, D.M. Inside the skin: the local immune and inflammatory milieu in leprosy. **Am. J. Med. Hyg.**, v.44, n.4, p.17-23, 1991, Suppl..

SFIKAKIS, P.P., MCCUNE, B.K., TSOKOS, M., ARONI, K., VAYIOPOULOS, G., TSOKOS, G.C. Immunohistological demonstration of transforming growth factor- β isoforms in the skin of patients with systemic sclerosis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, v.69, n.2, p.199-204, 1993.

SHARMA, K., ZIYADEH, F.N. The emerging role of transforming growth factor- β in kidney diseases. **Am. J. Physiol.**, v.266, p.F829-F842, 1994.

SHER, A., GAZZINELLI, R.T., OSWALD, I.P., CLERICI, M., KULLBERG, M., PEARCE, E.J., BERZOFSKY, J.A., MOSMANN, T.R., JAMES, S.L., MORSE III, H.C., SHEARER, G.M. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immun. Rev.**, n.127, p.183-204, 1992.

SHULL, M.M., ORMSBY, I., KIER, A.B., PAWLOWSKI, S., DIEBOLDI, R.J., YIN, M., ALLEN, R., SIDMAN, C., PROETZEL, G., CALVIN, D., ANNUNZIATA, N., DOETSCHMAN, T. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. **Nature**, v.359, p.693-699, 1992.

- SIBLEY, L.D., HUNTER, S.W., BRENNAN, P.J., KRAHENBUHL, J.L. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. **Infect. Immun.**, v.56, p.1232-1236, 1988.
- SIBLEY, L.D., KRAHENBUHL, J.L. *Mycobacterium leprae* burdened macrophages are refractory to activation by gamma-interferon. **Infect. Immun.**, v.55, p.446-450, 1987.
- SIELING, P.A., ABRAMS, J.S., YAMAMURA, M., SALGAME, P., BLOOM, B.R., REA, T.H., MODLIN, R.L. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. **J. Immunol.**, v.150, n.12, p.5501-5510, 1993.
- SIELING, P.A., MODLIN, R.L. T cell and cytokine patterns in leprosy skin lesion. **Springer Semin. Immunopathol.**, v.13, p.413-426, 1992.
- SIELING, P.A., WANG, X.-H., GATELY, M.K., OLIVEROS, J.L., MCHUGH, T., BARNES, P.F., WOLF, S.F., GOLKAR, L., YAMAMURA, M., YOGI, Y., UYEMURA, K., REA, T.H., MODLIN, R.L. IL-12 regulates T helper type 1 cytokine response in human infectious disease. **J. Immunol.**, v.153, p.3639-3647, 1994.
- SILVA, C.L., FACCIOLI, L.H., FOSS, N.T. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae*. **Int. J. Lepr.**, v.61, n.1, p.107-108, 1993.
- SILVA, C.L., FOSS, N.T. Tumor necrosis factor in leprosy. **J. Infect. Dis.**, v.159, n.4, p.787-790, 1989.

- SILVA, J.S., TWARDZIK, D.R., REED, S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor- β (TGF- β). **J. Exp. Med.**, v.174, p.539-546, 1991.
- SIVASAI, K.S.R., PRASAD, H.K., MISRA, R.S., RAMESH, V., WILFRED, D., NATH, I. Effect of recombinant interferon gamma: administration on lesional monocytes/macrophages in lepromatous leprosy patients. **Int. J. Lepr.**, v.61, n.2, p.259-269, 1993.
- SMYTH, M.J., STROBL, S.L., YOUNG, H.A., ORTALDO, J.R., OCHOA, A.C. Regulation of lymphokine-activated killer activity and pore-forming protein gene expression in human peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes. **J. Immunol.**, v.146, p.3289-3297, 1991
- SPORN, M.B., ROBERTS, A.B. Transforming growth factor- β : recent progress and new challenges. **J. Cell Biol.**, v.119, n.5, p.1017-1021, 1992.
- SPORN, M.B., ROBERTS, A.B., WAKEFIELD, L.M., DE CROMBRUGGHE, B. Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor-beta. **J. Cell Biol.**, v.105, p.1039-1045, 1987.
- STACH, J.L., STROBEL, M., FUMOUX, F., BACH, J.F. Defect in the generation of cytotoxic T cells in lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.48, p.633-640, 1982.
- STEINHOFF, U., KAUFMANN, S.H.E. Specific lysis by CD8⁺ T-cells of Schwann cells expressing *Mycobacterium leprae* antigens. **Eur. J. Immunol.**, v.18, p.969-972, 1988.
- STEINHOFF, U., WAND-WÜRTTENBERGER, A., BREMERICH, A., KAUFMANN, S.H.E. *Mycobacterium leprae* renders Schwann cells and

mononuclear phagocytes susceptible or resistant to killer cells. **Infect. Imm.**, v. 59, n.2, p.684-688, 1991.

STENGER, S., THÜRING, H., RÖLLINGHOFF, M., BOGDAN, C. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. **J. Exp. Med.**, v.180, p.783-793, 1994.

STEVENS, T.L., BOSSIE, A., SANDERS, V.M., FERNANDEZ-BOTRAN, R., COFFMAN, R.L., MOSMANN, T.R., VITETTA, E.S. Regulation of antibody isotype secretion by subsets of antigen-specific helper T cells. **Nature**, v.334, p.255-258, 1988.

STREET, N.E., SCHUMACHER, J.H., FONG, T.A.T., BASS, H., FIORENTINO, D.F., LEVERAH, J.A., MOSMANN, T.R. Heterogeneity of mouse helper T cells: Evidence from bulk cultures and limiting dilution cloning for precursors of Th1 and Th2 cells. **J. Immunol.**, v.144, n.6, p.1629-1639, 1990.

SU, H.C., ISHIKAWA, R., BIRON, C.A. Transforming growth factor- β expression and natural killer cell responses during virus infection of normal, nude, and SCID mice. **J. Immunol.**, v.151, n.9, p.4874-4890, 1993.

SURCEL, H.M., TROYE-BLOMBERG, M., PAULIE, S., ANDERSSON, G., MORENO, C., PASVOL, G., IVANYI, J. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. **Immunol.**, v.81, p.171-176, 1994.

SUZUMURA, A., SAWADA, M., YAMAMOTO, H., MARUNOUCHI, T. Transforming growth factor- β suppresses activation and proliferation of microglia *in vitro*. **J. Immunol.**, v.151, n.4, p.2150-2158, 1993.

TADA, T., OHZEKI, S., UTSUMI, K., TAKIUCHI, H., MURAMATSU, M., LI, X.-F., SHIMIZU, J., FUJIWARA, H., HAMAOKA, T. Transforming growth factor- β induced inhibition of T cell function. **J. Immunol.**, v.146, n.3, p.1077-1082, 1991.

TSUNAWAKI, S., SPORN, M., DING, A., NATHAN, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . **Nature**, v. 334, p.260-263, 1988.

VACHULA, M., HOLZER, T.J., ANDERSEN, B.R. Suppression of monocyte oxidative response by phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. **J. Immunol.**, v.42, p.1696-1701, 1989.

VACHULA, M., WOROBEK, S., ANDERSEN, B.R. A comparison of monocyte oxidative responses in leprosy patients and healthy subjects as influenced by mycobacterial lipid treatment. **Int. J. Lepr.**, v.58, p.534-539, 1990.

VAN VOORHIS, W.C., KAPLAN, G., SARNO, E.N., HORWITZ, M.A., STEINMAN, R.M., LEVIS, W.R., NOGUEIRA, N., HAIR, L.S., GATTAS, C.R., ARRICK, B.A., COHN, Z.A. The cutaneous infiltrates of leprosy: cellular characteristics and predominant T-cell phenotypes. **N. Engl. J. Med.**, v.307, n.26, p.1593-1597, 1982.

VODOVOTZ, Y., BOGDAN, C., PAIK, J., XIE, Q.-W., NATHAN, C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β . **J. Exp. Med.**, v.178, p.605-613, 1993.

VOLC-PLATZER, B., STEMBERGER, H., LUGER, T., RADASZKIEWICZ, T., WIEDERMANN, G. Defective intralesional interferon-gamma activity in

patients with lepromatous leprosy. **Clin. Exp. Immunol.**, v.71, p.235-240, 1988.

WAHL, S.M. Transforming growth factor beta (TGF- β) in inflammation: a cause and a cure. **J. Clin. Immunol.**, v.12, n.2, p.61-74, 1992.

WAHL, S.M., HUNT, D.A., BANSAL, G., MCCARTNEY-FRANCIS, N., ELLINGSWORTH, L., ALLEN, J.B. Bacterial cell wall-induced immunosuppression: role of transforming growth factor β . **J. Exp. Med.**, v.168, p.1403-1417, 1988.

WAKEFIELD, L.M., SMITH, D.M., FLANDERS, K.C., SPORN, M.B. Latent transforming growth factor-beta from human platelets: a high molecular weight complex containing precursor sequences. **J. Biol. Chem.**, v.263, n.16, p.7646-7654, 1988.

WAKEFIELD, L.M., WINOKUR, T.S., HOLLANDS, R.S., CHRISTOPHERSON, K. Recombinant latent transforming growth factor β 1 has a longer plasma half-life in rats than active transforming growth factor β 1, and a different tissue distribution. **J. Clin. Invest.**, v.86, p.1976-1984, 1990.

WATERS, M.F.R., TURK, J.L., WEMAMBU, S.N.C. Mechanisms of reactions in leprosy. **Int. J. Lepr.**, v.39, n.2, p.417-428, 1971.

WATSON, S., BULLOCK, W., NELSON, K., SCHAUF, V., GELBER, R., JACOBSON, R. Interleukin 1 production by peripheral blood mononuclear cells from leprosy patients. **Infect. Immun.**, v.45, n.3, p.787-789, 1984.

WEMAMBU, S.N.C., TURK, J.L., WATERS, M.F.R., REES, R.J.W.
Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the Arthus
phenomenon. **Lancet**, v.II, p.933-935, 1969.

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