

CARACTERIZAÇÃO DOS MACRÓFAGOS PRESENTES NAS LESÕES CUTÂNEAS DA HANSENIASE: ESTUDO POR MONOCLONAIS

Euzenir Nunes SARNO (1), Fátima de Barros Fonseca ALVARENGA (2), Leila Maria Machado VIEIRA (2), & Paulo R. Cotrim de SOUZA (3)

R E S U M O

As lesões cutâneas de 16 pacientes com hanseníase foram estudadas por imunofluorescência com anticorpos monoclonais anti-monócitos (OKM1 e anti-MO) e anti-Ia (OKIa). Foi avaliada a atividade de fosfatase ácida utilizando-se naftol AS-B1 fosfato como substrato.

Os macrófagos parecem constituir uma população heterogênea em relação aos antígenos estudados neste trabalho e quanto a atividade enzimática. Em todas as formas estudadas um grande número de células eram OKIa positivas.

UNITERMOS: Hanseníase; Macrófagos; Anticorpos monoclonais.

I N T R O D U Ç Ã O

Anticorpos monoclonais dirigidos contra antígenos presentes na superfície celular, tem sido um eficiente método para analisar sub-populações celulares no homem⁹. Se para as diversas sub-populações de linfócitos (ly) foi possível obter monoclonais capazes de identificar todas as células de uma determinada subpopulação⁸ para as células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) as dificuldades parecem maiores uma vez que além de sofrerem um processo de maturação a partir da medula, os monócitos do sangue alcançam o tecido e no local da inflamação podem se diferenciar para células epitelióides e células gigantes além de sofrerem modificações morfológicas e funcionais¹³. Nesse processo de maturação e diferenciação admite-se que antígenos de membrana possam ser perdidos e outros possam ser expostos daí, a diversidade

observada pelos monoclonais para esta categoria celular¹².

A hanseníase exibe um largo espectro de formas clínicas variando da forma tuberculóide, com alta imunidade, à forma virchowiana com evidência de imunidade celular deprimida⁷. Entre as formas denominadas polares há uma gama de tipos mistos designados "borderline" na classificação de RIDLEY e JOPLING¹⁰. Em todas as formas as lesões histológicas se caracterizam pelos diferentes padrões de maturação e diferenciação mostrados pelas células do SFM. Na forma tuberculóide predominam as células epitelióides com formação de granulomas. E na forma virchowiana predominam os macrófagos maduros, tipo histiocíticos com graus variados de vacuolização citoplasmática. RIDLEY e JO-

(1) Chefe do Setor de Hanseníase do Instituto Oswaldo Cruz.

(2) Professores Assistentes da Disciplina de Patologia Geral da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

(3) Médico do Serviço de Dermatologia do Hospital de Bonsucesso.

Endereço para correspondência: Fundação Oswaldo Cruz — Setor de Hanseníase — Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21.041 - Caixa Postal 926 - Rio de Janeiro, Brasil.

PLING chamaram a atenção para correlação entre a diversidade do infiltrado celular e o grau de resistência do hospedeiro¹⁰.

O objetivo do presente trabalho foi analisar a distribuição das subpopulações de macrófagos presentes nas lesões da hanseníase através de 3 anticorpos monoclonais. Dois deles dirigidos contra antígenos monocitários e outro contra antígenos DR (Ia like).

MATERIAL E MÉTODOS

Biópsias — Foram selecionados 8 casos de hanseníase do pólo tuberculóide do espectro (formas tuberculóides e "bordeline" tuberculóide) e 8 casos de hanseníase do pólo virchowiano (formas virchowiana e "bordeline" virchowiana). Essas biópsias eram obtidas por "punch" (5 mm) ou por procedimento cirúrgico. Cada biópsia era dividida em 2 partes imediatamente após a retirada. Um dos fragmentos era embebido em Tissue-Tek e congelado em nitrogênio líquido até o momento de processar para imunofluorescência, utilizando método descrito previamente com detalhe¹¹. Cortes de 5 μ foram obtidos em Criostato Cryo-Cut II, American Optical. Após secar ao ar 30 minutos (min) em ambiente refrigerado, os cortes foram fixados em acetona por 10 min. e em seguida lavados 3 vezes por 10 min. cada em tampão fosfato (PBS) pH 7,4. Os cortes foram incubados à temperatura ambiente em câmara úmida, por 60 min. com anticorpos monoclonais OKIa, OKM1 (Orthoclone, Ortho Pharmaceutical Co.) e anti-MO gentilmente fornecido por Dr. Van Voorhis da Universidade Rockefeller. Após 3 lavagens em PBS pH 7,4 os cortes foram incubados por 30 min., com IgG anti-camundongo biotinilada (Vector Lab.), lavados em 3 banhos de PBS pH 7,4, e tratados com avidina-fluoresceína por 30 min. Finalmente lavados em PBS, fixados em formol tamponado a 10% sendo as lâminas montadas em Elvanol (polivinil álcool da Sigma).

A leitura foi realizada em Microscópio SM 20 Leitz-Dialux.

Após exame dos cortes, fez-se a quantificação das células pela contagem por campos de células positivas na derme para cada monoclonal, contando-se um mínimo de 10 campos para

cada corte com objetiva de 40 e ocular de 10, selecionando-se os campos onde havia maior concentração de células positivas. Esta seleção de campos evitou que áreas de derme sem infiltrado fossem interpretadas como áreas de infiltrado negativas para o tipo celular examinado. Um dos cortes do fragmento da biópsia congelada foi corado pela hematoxilina — eosina (HE) e as células inflamatórias do SFM foram quantificadas da mesma forma que a contagem realizada para os monoclonais.

O outro fragmento era submetido ao método histoquímico para fosfatase ácida como previamente descrito¹¹. O fragmento era inicialmente fixado 24h a 4°C em formol sacarose tamponado pH 6,8¹. Em seguida transferido para solução de Holt (sacarose 30 g, goma arábica 1 g e água destilada 100 ml). Após 24 horas a 4°C o material foi lavado por 10 min. em água corrente e depois de secar em papel de filtro, foi embebido em Tissue-Tek e congelado em nitrogênio líquido. Cortes de 2 μ de espessura foram obtidos (Cryo-Cut II), utilizando-se lâminas previamente albuminizadas (5%). As secções foram incubadas em uma solução contendo tampão acetato pH 5,0, 50 ml, naftol AS-BI fosfato (Sigma) 100 mg dissolvidos em 0,5 ml de dimetilformamida e 2 ml de pararosanilina hexazotizada, por 30-60 min. a 37°C. Em seguida lavados 3 vezes em água destilada, 1 vez em PBS pH 7,4. Finalmente os cortes eram contrastados com verde metila (1%) por 30-60 segundos para a coloração de fundo, lavados em água destilada e após secar montados com Permount. Para leitura das células com atividade para fosfatase ácida procedeu-se do mesmo modo que para os monoclonais.

As lâminas destinadas ao diagnóstico histológico (HE) assim como o Ziehl-Nielsen eram obtidas do fragmento destinado a histoquímica.

Reagentes:

- OKIa da linha Orthoclone (Ortho Pharmaceutical Co.). Identifica células T ativadas, macrófagos e linfócitos B;
- OKM1 da linha Orthoclone (Ortho Pharmaceutical Co.). Identifica monócitos, neutrófilos e macrófagos;
- Anti-MO (cedido por Dr. Van Voorhis — Universidade Rockefeller). Identifica monócitos.

- Anti-IgG de camundongo biotinizada obtida em cavalo (Vector Lab.);
- Avidina-Fluoresceína (Vector Lab.);
- Naftol AS-BI fosfato (Sigma);
- Dimetilformamida (Sigma);
- Pararosanilina hexazotizada (Sigma)*;
- Verde Metila (Merck);

* Solução estoque de pararosanilina: pararosanilina hidrocloreica 2 g, água deionizada 40 ml, HCl 2N-10 ml. Pararosanilina hexazotizada (PRH): Solução estoque de pararosanilina 2 ml e nitrito de sódio 4%-2ml.

RESULTADOS

A identificação de células do SFM pela hematoxilina-eosina foi expressa como número total de células.

A avaliação da atividade de fosfatase ácida que é uma enzima encontrada nos vacuólos lisossomais identifica células do SFM com uma coloração vermelha citoplasmática dada sobre o substrato naftol AS-BI fosfato. Nos casos de tuberculóides (Fig. 1), raras células gigantes mostram citoplasma positivo, os macrófagos mostram positividade citoplasmática difusa mal delimitada. Algumas células com morfologia semelhante as epitelióides eram positivas, porém não se pode assegurar que todos o sejam. Nos casos virchowianos (Fig. 2) o citoplasma dos macrófagos exibiam grandes vacuólos confluentes com conteúdo enzimático em geral concentrado na periferia vacuolar. Algumas células continham globias intra-vacuolares nos casos "bordeline" virchowianos predominavam macrófagos microvacuolares com atividade enzimática pronunciada.

A identificação de células positivas por imunofluorescência com os anticorpos monoclonais OKM1, anti-MO e anti-Ia era determinada por fluorescência em membrana ocupando toda a superfície celular como também segmentos da membrana. As células positivas para OKM1 nas formas tuberculóides eram pequenas e redondas (Fig. 3) tendo sob a imunofluorescência morfologia semelhante a da marcação de linfócitos em geral por anticorpos monoclonais. Algumas células maiores eram também marcadas de forma



Fig. 1 — Granuloma tuberculóide contendo macrófagos, algumas células epitelióides e células gigantes apresentando atividade fosfatase ácida. 40X.



Fig. 2 — Foto 2: Lesão lepromatosa mostrando macrófagos vacuolizados contendo atividade enzimática fosfatase ácida perivacuolar. 40X.



Fig. 3 — Granuloma tuberculóide apresentando células isoladas positivas. Anticorpo monoclonal OKM1. 40X.

bastante tênue porém a correlação morfológica com o HE não era precisa, não se podendo caracterizar as células epitelióides e gigante quanto à positividade para o OKM1.

Os macrófagos presentes nos casos virchowianos exibiam heterogeneidade com relação a ambos os antígenos monocitários detectados pelos monoclonais. A positividade variava de células com forte fluorescência à células negativas notando-se várias com positividade segmentar em membrana celular (Fig. 4), sem entretanto haver correlação com a intensidade de fluorescência e a carga bacilar. Alguns destes macrófagos exibiam autofluorescência.

O número de células positivas para o OKM1 e anti-MO (Tabelas 1 e 2) era diverso, bem inferior ao total de células do SFM identificadas pelo HE e pelo FAC, cujo total de células positivas também era notavelmente inferior ao valor total do HE.

A intensidade da fluorescência de membrana do OKIa era bem forte em relação aos outros dois anticorpos utilizados (Fig. 6) e a quantidade de células bastante elevada (Tabelas 1 e 2). Estas células formavam amplos grupos correspondendo por vezes a totalidade de uma área do infiltrado inflamatório (Fig. 6).

A comparação entre os percentuais encontrados para as formas tuberculóide e virchowiana (Tabela 3) nos mostra que o percentual de



Fig. 4 — Infiltrado de macrófago na lepra lepromatosa. Grande número de células positivas com diferente intensidade. Anticorpo monoclonal OKM1. 40X.



Fig. 5 — Mesmo caso anterior corado pelo anticorpo monoclonal Anti-MO. Quase todas as células são positivas. 40X.

TABLE 1

Distribuição dos macrófagos identificados pelos monoclonais e por atividade de fosfatase ácida nos casos de tuberculóides

Nome	OKM1	Anti-MO	OKIa	FAC	HE
MLS	35 ± 8	34 ± 7	96 ± 37	106 ± 71	233 ± 68
JMG	23 ± 12	0	42 ± 16	23 ± 14	321 ± 58
JDH	24 ± 4	24 ± 6	69 ± 18	19 ± 8	235 ± 43
JMS	29 ± 11	34 ± 9	53 ± 27	18 ± 6	348 ± 66
MFS	11 ± 10	3 ± 7	75 ± 27	45 ± 15	266 ± 155
NSG	8 ± 8	0	61 ± 20	42 ± 9	277 ± 114
ACS	0	6 ± 1	25 ± 8	35 ± 6	257 ± 137
MA	36 ± 5	28 ± 10	37 ± 5	43 ± 11	180 ± 46
Média	(20,75 ± 12,28)	(16,12 ± 14,30)	(57,25 ± 21,41)	(41,37 ± 26,49)	(264,62 ± 49,22)

FAC — Atividade fosfatase ácida.

0 — Nenhuma célula positiva.

TABLE 2

Distribuição dos macrófagos identificados pelos monoclonais OKM1 e anti-MO e por atividade fosfatase ácida nos virchowianos.

Nome	OKM1	Anti-MO	OKIa	FAC	HE
FLM	14 ± 9	6 ± 6	45 ± 16	43 ± 16	115 ± 21
GBC	12 ± 2	12 ± 6	108 ± 43	120 ± 59	275 ± 30
IIR	13 ± 1	34 ± 6	51 ± 4	36 ± 9	123 ± 43
JMC	13 ± 4	10 ± 4	15 ± 3	36 ± 11	118 ± 65
ASP	14 ± 8	45 ± 10	53 ± 7	158 ± 18	207 ± 60
APA	0	1 ± 1	0	44 ± 4	211 ± 58
DMCO	13 ± 4	23 ± 4	12 ± 3	81 ± 23	169 ± 89
JBN	12 ± 2	19 ± 2	23 ± 4	90 ± 22	207 ± 15
Média	11,37 ± 4,35	18,75 ± 13,87	38,37 ± 32,04	76 ± 42,12	178,12 ± 53,44



Fig. 6 — Infiltrado de macrófagos em lesão lepromatosa exibindo expressão de antígeno Ia-like em quase todas as células. Anticorpo monoclonal anti-DR. 40X.

células OKIa positivas era semelhante para ambos os grupos estudados embora este valor fosse pelo menos duas vezes maior que o encontrado com os marcadores monocitários, com os quais o percentual obtido foi baixo. Em relação a atividade de fosfatase ácida, nos casos de virchowianos 42,66% das células com identificação morfológica de fagocíticas mononucleares apresentavam atividade enzimática enquanto que apenas 15,63% das células nos casos tuberculóide eram positivas.

DISCUSSÃO

A utilização de anticorpos monoclonais na identificação de macrófagos presentes em lesões

TABLE 3

Comparação entre os percentuais obtidos nos casos de tuberculóides e virchowianos para cada marcador

	OKM1	Anti-MO	OKIa	FAC
Casos T	7,84	6,09	21,63	15,63
Casos L	6,38	10,52	21,54	42,73

$$\% = \frac{\text{Média de células positivas}}{\text{Média de células contadas no HE}} \times 100$$

cutâneas da hanseníase demonstrou que essas células constituem uma população heterogênea.

Foi demonstrado anteriormente que 75 a 84% das células aderentes provenientes da população mononuclear sangüínea de pacientes com hanseníase eram identificadas por anticorpo anti-monócito (OKM1), não sendo feita a marcação das células nas lesões⁶. Outros autores porém referem que o antígeno identificado pelo anticorpo OKM1 está presente em células histiocíticas, em lesões, sem variações no espectro da doença⁵. No presente trabalho o número de células identificadas por anticorpos contra monócitos foi em geral muito menor quando comparado com a identificação pela coloração de rotina (HE). Isto pode ser devido ao fato da identificação de células do SFM pelo HE não ser precisa pois a morfologia em reações inflamatórias e também neoplasias nos mostram que nem sempre a identificação morfológica é precisa por isso a necessidade de técnicas enzimáticas e imunohistológicas para caracterização de populações celulares.

Outra explicação para o pequeno número de células do SFM marcadas pelos monoclonais é uma possível perda dos antígenos durante o processo de maturação a partir dos monócitos. Na maioria dos casos o número de células com atividade enzimática também foi menor do que o total de células vistas no HE.

As observações sugerem que cada um dos anti-monócitos aqui usados identifica antígenos diferentes embora não fosse possível assegurar com nenhum deles a positividade para células epitelióides ou células gigantes com técnica de imunofluorescência, o que talvez pudesse ser visualizado com técnicas imunoenzimáticas como a imunoperoxidase, com coloração e contraste. Já a identificação pela atividade de fosfatase ácida a identificação morfológica pode ser feita, notando-se inclusive positividade em células com morfologia epitelióide e em raras células gigantes.

A diversidade de como as células de Virchow exibem positividade para os anticorpos marcadores de monócitos sugere que elas constituem uma população heterogênea, heterogeneidade que está não relacionada à carga bacilar já que tanto na forma LL quanto na BL o padrão de positividade para as células de Virchow era semelhante.

Outro resultado interessante é o número elevado de células OKIa positivas encontrado em todos os casos com percentual semelhante nos grupos estudados, o que sugere que uma deficiência de células apresentadoras de antígeno não deve ser um fator importante na determinação da baixa resposta imune ao *M. leprae*, como foi entre outras hipóteses, questionado por outros autores².

SUMMARY

Characterization of mononuclear phagocytes in leprosy skin lesions: a monoclonal study.

The skin lesions from 16 leprosy patients were studied by immunofluorescence technique using monoclonal antibodies against monocytes (OKM1 and Anti-Mo) and Ia-like antigen. Acid phosphatase activity was evaluated using naphthol AS-BI phosphate as substrate.

The macrophages seem to be a heterogeneous population in concern with the antigens here studied as well as the enzymatic activity.

Ia-like antigen was expressed in a great number of cells throughout the clinical spectrum.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BOLTON, W. K. & MESNARD, R. M. — New technique of kidney tissue processing for immunofluorescence microscopy: formol sucrose/gum sucrose/paraffin. *Lab. Invest.* 47: 206-213, 1982.
2. GODAL, T. — Immunological aspects of leprosy: present status. *Progr. Allergy*, 25: 211-242, 1978.
3. MODLIN, R. L.; HOFMAN, F. M.; HORWITZ, D. A.; HUSMANN, L. A.; GILLIS, S.; TAYLOR, R. & THOMAS, R. — In situ identification of cells in human leprosy granulomas with monoclonal antibodies to interleukin 2 and its receptor. *J. Immunol.* 132: 3085-3090, 1984.
4. 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.*, 51: 421-429, 1983.
5. NOGUEIRA, N.; KAPLAN, G.; LEVY, E.; SARNO, E. N.; RISHNEU, R.; GRANELLI-PIPERNO, A.; VIEIRA, L.; GOULD, V. C.; LEVIS, W.; STEINMAN, R.; YIP, Y. K. & COHN, Z. A. — Defective interferon production in leprosy. Reversal with antigen and interleukin-2. *J. exp. Med.*, 158: 2165-2170, 1983.
6. REINHERZ, E. L.; KUNG, P. C.; PESANDO, J. M.; RITZ, J.; GOLDSTEIN, G. & SCHLOSSMANN, S. F. — Ia determinants on human T-cell subsets defined by monoclonal antibody: activation stimuli required for expression. *J. exp. Med.*, 150: 1472-1482, 1979.
7. REINHERZ, E. L. & SCHLOSSMAN, S. F. — The differentiation and function of human T lymphocytes. *Cell*, 19: 821-825, 1980.
8. RIDLEY, D. S. & JOPLING, W. H. — Classification of leprosy according to immunity: a five group system. *Int. J. Leprosy*, 34: 255-273, 1966.
9. SARNO, E. N. & VIEIRA, L. M. M. — Métodos histoquímicos para identificação de linfócitos e macrófagos. *Mem. Inst. Osw. Cruz*, 79: 59-62, 1984.
10. SPRINGER, T. A. — Monoclonal antibodies as tools for the study of mononuclear phagocytes. In: ADAMS, D. O.; EDELSON, P. J. & KOREN, J., ed. *Methods for studying mononuclear phagocytes*. New York, Academic Press, 1981. p. 305-313.
11. VAN FURT, R. — Identification of mononuclear phagocytes: overview and definitions. In: ADAMS, D. O.; EDELSON, P. J. & KOREN, J., ed. *Methods for studying mononuclear phagocytes*. New York, Academic Press, 1981. p. 243-251.
12. VAN VOORHIS, W. C.; KAPLAN, G.; SARNO, E. N.; HORWITZ, M. A.; STEINMAN, R. M.; LEVIS, W. R.; NOGUEIRA, N.; HAIR, L.; GATTASS, C. R.; ARRICH, B. A. & COHN, Z. A. — The cutaneous infiltrates of leprosy. *New Engl. J. Med.*, 307: 1593-1597, 1982.

Recebido para publicação em 16/02/1987.