

Detecção de determinantes antigênicos compartilhados entre a proteína de choque térmico 65 do *Mycobacterium leprae* e proteína de choque térmico 60 humana

Detection of shared antigenic determinants between Mycobacterium leprae heat shock protein 65 and human heat shock protein 60

David Njoo¹
Ricardo.V.P. Hu²
Bhupendra Tank³
Arend.H.J.Kolk⁴
Angela Kooy⁵
René Kant⁶
Bernard Naafs⁷

RESUMO

Nestes estudos foram investigados se o *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*) e o homem compartilham determinantes antigênicos que podem estar localizados nas Proteínas de Choque Térmico (HSPs) e que podem ser

responsáveis pela destruição tecidual. Usando-se técnica de coloração única pela imunoperoxidase em cortes feitos com criostato, observaram-se três anticorpos que eram dirigidos contra HSP-60 (anticorpos policlonais SPA-804, SPA-805 e o anticorpo monoclonal SPA-807), que provavelmente reagem especificamente com macrófagos e células epitelióides em biópsias cutâneas de pacientes com hanseníase. No Western Blot foi observado que todos os anticorpos contra HSP-60 humana e anticorpos monoclonais (MoAbs) contra HSP-65 do *M. leprae* (F47-10, F67-18, F88-1) reagem intensamente com as proteínas do *M. leprae* sonificado com peso molecular de 65 kDa, indicando semelhança de alguns determinantes antigênicos entre HSP-60 humana e HSP-65 do *M. leprae*. Subseqüentemente, um estudo imunoistoquímico comparativo dos padrões de coloração de anticorpos contra HSP-60 humana e anticorpos contra HSP-65 do *M. leprae*, usando cortes cutâneos feito em criostato de hanseníase paucibacilar (PB), multibacilar (MB) e outras doenças granulomatosas, revelaram que os MoAbs F47-10 e F67-18 reagem somente fracamente com os granulomas em hanseníase PB e em outras doenças granulomatosas cutâneas, mas coravam o granuloma da hanseníase MB intensamente. O MoAb F88-1 e os anticorpos policlonais SPA-804, SPA-805 e o MoAb SPA-807 coraram os granulomas dos pacientes PB e de outras doenças cutâneas granulomatosas com a mesma

¹ MD, PhD, Department of Dermatology and Venereology, Dijkzigt Hospital, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands. Department of Dermatology and Venereology, Academic Medical Centre University of Amsterdam, The Netherlands

² MD, Dermatovenereologist, Department of Dermatology and Venereology, Dijkzigt Hospital, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands. Department of Dermatology and Venereology, Academic Hospital Paramaribo, Surinam.

³ PhD, Department of Dermatology and Venereology, Dijkzigt Hospital, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands.

⁴ PhD, N.H. Swellengrebel Laboratory of Tropical Hygiene, Royal Tropical Institute, Amsterdam, The Netherlands.

⁵ PhD, Department of Dermatology and Venereology, Dijkzigt Hospital, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands.

⁶ MT, Department of Dermatology and Venereology, Dijkzigt Hospital, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands.

⁷ M.D, Ph.D, Dermatovenereologist, Department of Dermatology and Venereology, Dijkzigt Hospital, Erasmus University Rotterdam, The Netherlands. Department of Dermatology and Venereology, Academic Hospital Leiden, The Netherlands. Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, SP, Brasil. Address of correspondence: B. Naafs, M.D. Ph.D. Gracht 15, 8485KN Munnekeburen, The Netherlands. e-mail: bennaafs@dds.nl

intensidade daquela nos pacientes MB. Utilizando-se uma técnica de dupla coloração, observou-se que os determinantes antigênicos reconhecidos pelo MoAb contra HSP-60 humana (SPA-807) e os MoAbs contra a HSP-65 do *M. leprae* (F67-18, F47-10, F88-1) estavam, na maioria das vezes, localizados nos macrófagos. Esses achados não contradizem nossa hipótese de que semelhanças entre determinantes antigênicos nas HSPs no *M. leprae* e no hospedeiro humano podem ser, no mínimo em parte, responsáveis pela indução de uma reação autoimune na hanseníase causando formação de granuloma com subseqüente dano tecidual. Os resultados deste estudo também indicaram que alguns destes determinantes estão provavelmente localizados na HSP-60. Uma explicação similar possivelmente se aplique aos achados em outras doenças granulomatosas, como por exemplo, na sarcoidose provavelmente induzida por micobactéria, e na necrobiose lipoídica relacionada ao diabetes, nas quais considera-se que epítomos semelhantes existam entre a HSP-65 bacteriana e a HSP-60 humana e desempenhem um papel importante.

Descritores: hanseníase, doenças granulomatosas, autoimunidade, proteínas de choque térmico, HSP-60, HSP-65, imunopatologia, Western blot.

INTRODUÇÃO

O compartilhamento de determinantes antigênicos entre parasita e hospedeiro foi primeiramente descrito por Damian em 1964 (DAMIAN, 1964). Este fenômeno chamado “mimetismo antigênico” foi sugerido como uma possível explicação para as manifestações clínicas e histopatológicas da hanseníase (NAAFS et al., 1990; VAN DEN AKKER et al., 1992; RAMBUKKANA et al., 1992).

Os determinantes antigênicos comuns do *M. leprae* e do hospedeiro podem levar ou a um estado de tolerância ou a um estado de autoimunidade. Por um lado, o mimetismo antigênico permite que o parasita sobreviva nos tecidos humanos porque o sistema imune falha em reconhecer os antígenos como “não próprios”. Uma tal situação pode ocorrer na hanseníase virchowiana (VV), na qual os tecidos do paciente ficam repletos de micobactérias, e uma imunidade específica mediada por células (IMC) contra antígenos do *M. leprae* está ausente. Por outro lado, determinantes antigênicos compartilhados pelo *M. leprae* e o hospedeiro podem induzir uma reação autoimune contra os antígenos do próprio hospedeiro. Isto poderia explicar as respostas imunes observadas na hanseníase tuberculóide (TT) e durante uma Reação Reversa (RR). Uma IMC alta contra os antígenos do *M. leprae* pode então ser observada e ocorre a formação de

um granuloma destrutivo com edema na derme e nos nervos periféricos superficiais. Contudo, os antígenos responsáveis ainda permanecem desconhecidos. Estudos anteriores relataram que o *M. leprae*, as micobactérias ambientais e o tecido humano (pele e nervos) têm determinantes antigênicos em comum (NAAFS et al., 1990; VAN DEN AKKER et al., 1992). Estas observações deram suporte à noção de que a autoimunidade pode estar envolvida no dano tecidual na hanseníase. Foi através de métodos imunistoquímicos que, pela primeira vez, foi demonstrada a reação cruzada entre os MoAbs anti-*M. leprae* e a pele humana (NAAFS et al., 1990). Subseqüentemente, com a utilização de um sistema *immunoblot* foi descrita semelhança entre antígenos micobacterianos e determinantes na epiderme humana normal (VAN DEN AKKER et al., 1992). Parecia que muitos dos MoAbs anti *M. leprae* utilizados naqueles estudos eram dirigidos contra determinantes antigênicos pertencentes a proteínas conservadas durante a evolução e denominadas de “Proteínas de Choque Térmico” (Heat Shock Proteins-HSPs). As Proteínas de Choque Térmico ou “proteínas de estresse” são sintetizadas por organismos eucariotas e procaríotas como uma resposta fisiológica a eventos estressantes. Acredita-se que essas proteínas realizam funções autoprotetoras que são essenciais para a sobrevivência da célula (POLLA, 1991; 1991). As HSPs podem ser classificadas em cinco famílias principais, baseando-se em seu aparente peso molecular: HSP-100, HSP-90, HSP-70, HSP-60 e HSP-27 (MAYTIN, 1995). A seqüência de genes das HSPs entre o homem e microorganismos (patogênicos) parece mostrar notáveis semelhanças (DUDANI et al., 1989; GARSIA et al., 1989). Além do mais, antígenos altamente imunodominantes do *M. leprae* foram reconhecidos como homólogos das proteínas de estresse (YOUNG et al., 1987).

O objetivo do presente trabalho foi ampliar os estudos mencionados previamente (NAAFS et al., 1990; VAN DEN AKKER et al., 1992) a fim de verificar se alguns dos determinantes antigênicos compartilhados pelo *M. leprae* e o hospedeiro humano podem estar localizados nas Proteínas do Choque Térmico. Usando-se um conjunto de anticorpos comerciais disponíveis contra HSP de quatro famílias diferentes e um conjunto de anticorpos contra determinantes antigênicos do *M. leprae*, os seguintes trabalhos foram realizados:

- A- Estudou-se a reatividade específica dos anticorpos anti-HSP humano com determinantes antigênicos do *M. leprae* pela técnica de coloração por imunoperoxidase em cortes de pele de hanseníase multibacilar, feitos no criostato e pela técnica de Western Blot usando-se como antígeno *M. leprae* sonicado;
- B- Compararam-se os padrões de reatividade desses anticorpos com granuloma de hanseníase PB e MB e

outras doenças granulomatosas cutâneas;

C- A detecção *in situ* de determinantes antigênicos da HSP-60 humano e HSP-65 do *M. leprae* em macrófagos cutâneos em hanseníase PB e MB e outras doenças granulomatosas cutâneas, usando-se a técnica da dupla coloração.

Os resultados desses estudos mostraram que alguns dos determinantes antigênicos compartilhados pelo *M. leprae* e o hospedeiro humano e que podem ser em parte responsáveis pela patologia da hanseníase estão localizados na HSP-60.

MATERIAL E MÉTODOS

Fragmentos de biópsias

Biópsias de pele de nove pacientes com hanseníase e cinco pacientes com doenças granulomatosas cutâneas foram obtidas nos departamentos de Dermatologia e Venereologia do Hospital Acadêmico Dijkzigt em Rotterdam (Holanda) e Hospital Acadêmico em Paramaribo (Suriname). A pele humana normal foi obtida de duas pacientes que sofreram redução de mama no departamento de Cirurgia Plástica Reconstructiva do Hospital de Rotterdam. Os espécimes foram congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -70°C até o uso.

O diagnóstico histológico foi confirmado em cortes corados pela hematoxilina-eosina (HE). A coloração de Fite-Faraco-Wade foi usada para detectar a presença de bacilos álcool-ácido resistentes e a determinação do índice baciloscópico (IB) em fragmentos de pele de pacientes hansenianos.

Imunoistoquímica

Método de coloração única

Cortes congelados foram corados usando-se o método do complexo Avidina-Biotina como descrito por CATTORETTI et al., 1988.

Resumidamente: seções de $5\mu\text{m}$ cortadas em criostato foram colocadas em lâminas de vidro, secas ao ar e fixadas em acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente. As seções foram lavadas em tampão fosfato (PBS, pH 7,4) contendo 0,05% de Tween e pré-incubadas com 5% de soro albumina bovino em PBS durante 10 minutos para minimizar a coloração inespecífica. Subseqüentemente, as seções foram incubadas durante 60 minutos com uma diluição ótima do anticorpo primário. Depois foram lavadas duas vezes com PBS, contendo 0,05% de Tween e, incubadas durante 30 minutos com anticorpos secundários biotinilados; anticorpo de cabra anticamundongo na diluição 1:200

contendo 3% de soro de cabra normal (SCN) e 3% soro humano normal (SHN). As seções foram lavadas novamente, duas vezes, em PBS contendo Tween (0.05%) e incubadas durante 30 minutos com o complexo Avidina-Biotina diluído a 1:1.200 (kits-DAKO, DAKO A/S -Dinamarca). Logo após, as lâminas foram lavadas, duas vezes, com PBS (sem Tween). A reação de peroxidase foi desenvolvida incubando-se os cortes com uma concentração de 0,75 mg/ml de 3,3-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio a 0,25%, durante 7 minutos em campo escuro. As seções foram lavadas em água corrente e contra-corada, durante 60 segundos, com hematoxilina de Mayer e novamente lavadas em água corrente durante 5 minutos. A seguir, foram montadas em Malinol após a desidratação por passagens consecutivas em banhos de álcool e xilol.

Controles negativos consistiram na omissão de anticorpo primário.

Método da dupla coloração

Seções de $5\mu\text{m}$ cortadas em criostato foram fixadas durante 10 minutos em acetona, secas ao ar e lavadas em PBS. Elas foram incubadas durante 1 hora com o primeiro anticorpo monoclonal. Depois de lavadas com PBS, foram incubadas com anticorpos biotinilados de cabra anticamundongo na diluição 1:200 contendo 3% de SHN e 3% de SCN, durante 30 minutos. A seguir foram lavadas em PBS e incubadas com estreptavidina—Galactosidase diluída 1:2 (Laboratórios Biogenex, San Ramon, E.U.A.) durante 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS. A reação de -Galactosidase foi desenvolvida com o substrato -Galactosidase (0.72% cyanide Ferry/Ferro, 2.5% 5-bromo-4-chloro-3-indolyl -galactoside, 0.11% mgCl_2 em PBS) durante 30-45 minutos a 37°C . As seções foram lavadas em PBS durante 15 minutos e incubadas com o segundo anticorpo monoclonal durante 1 hora. Após nova lavagem com PBS, foram incubadas com anticorpos de coelho anticamundongo na diluição 1:50, contendo SHN a 1:50 e SCN diluído a 1:50, durante 30 minutos. Foram lavadas com PBS e incubadas com fosfatase alcalina antifosfatase alcalina na diluição 1:100 (APAAP), durante 45 minutos. Após lavagem com PBS as seções foram incubadas em 0,2M Tris-HCl pH 8,0 durante pelo menos 5 minutos. A reação de fosfatase alcalina foi desenvolvida incubando-se as seções em substrato AP (150 μl fucsina nova, 150 μl NaNO_3 , 18mg Naftol AS-MX fosfato e 15 mg Levamisol em 70 ml 0.2M Tris-HCl, pH 8,0) durante 30 minutos em temperatura ambiente e câmara escura. As seções foram lavadas em PBS e montadas em gelatina-glicerina de Kaiser.

Controles negativos consistiram na omissão de anticorpos primários e secundários. A porcentagem de

células coradas pela dupla-coloração no granuloma foi microscopicamente calculada por dois observadores independentes.

Anticorpos primários

Anticorpos mono e policlonais contra HSP humano foram comprados de StressGen, Victoria, Canadá. As suas características estão listadas na Tabela 1.

A diluição ótima para cada MoAbs anti-HSP humano foi estabelecida usando-se granuloma de pacientes hansenianos MB, porque determinantes

antigênicos do *M. leprae* provavelmente estão presentes em grande quantidade neste espectro da hanseníase. Pelo aumento gradual das diluições de cada anticorpo, esses anticorpos que marcaram o granuloma positivamente, mas não marcaram a epiderme, foram considerados úteis para os estudos B e C.

Foram obtidos três anticorpos monoclonais de camundongos contra três diferentes epítomos da proteína de 65 kDa do *M. leprae* (KOLK et al., 1984) (Tabela 2). O anticorpo monoclonal contra o marcador de macrófago CD68 (KP1) era da marca DAKO, Dinamarca (PULFORD et al., 1989).

Tabela 1. Anticorpos contra proteínas de choque térmico (StressGen) .

Nome do produto	Subclasse de imunoglobulina	Especificidade	Diluição para imunohistoquímica
SPA 820 ¹	IgG1 mouse monoclonal	anti-HSP-70 humana, formas constitutiva e indutível	1:500
SPA 815 ¹	IgG1 mouse monoclonal	anti-HSP-70 humana forma constitutiva	1:4000
SPA 810 ¹	IgG1 mouse monoclonal	anti-HSP-70 humana forma indutível	1:500
SPA 830 ²	IgG1 mouse monoclonal	anti-HSP-90 humana	1:2000
SPA 800 ³	IgG1 mouse monoclonal	anti-HSP-27 humana	1:4000
SPA 804 ⁴	rabbit polyclonal	anti-HSP-60 de cianobactéria	1:4000
SPA 805 ⁵	rabbit polyclonal	anti-HSP-60 do <i>H. virescens</i>	1:4000
SPA 807 ⁶	IgG1 mouse monoclonal	anti-HSP-60 humana	1:500

¹BOEHNCKE et al., 1994; ²TRAUTINGER et al., 1993 ³DALMAN et al., 1989. ⁴CIOCCA et al., 1982. ⁵WEBB et al., 1990. ⁶MILLER et al., 1986. ⁶BOOG et al., 1992.

Tabela 2. Especificidade dos anticorpos monoclonais contra diferentes epítomos da HSP-65 do *M. leprae* (KOLK et al., 1984)

Nome do produto	Isotipo	Diluição para imunohistoquímica
F 47-10	IgG1	1:3000
F 67-18	IgG1	1:1500
F 88-1	IgG2a	1:3000

A especificidade do anticorpo monoclonal contra o marcador de macrófago CD68 (KP1) foi confirmada através de titulação usando a epiderme de pacientes hansenianos multibacilares. A diluição ótima era 1:8000.

As colorações dos granulomas e a epiderme foram graduadas como segue:

- : Negativo
- + / -: Duvidoso
- +: Positivo fraco
- ++: Moderadamente positivo
- +++ : Fortemente positivo
- ++++: Muito fortemente positivo

M. leprae sonicado

O *M. leprae* purificado, originário de fígado de tatu infectado (DAS et al., 1982), foi macerado em um triturador de tecidos e sonicado a 4°C. O *M. leprae* sonicado (10mg/ml) foi cedido pelo Dr. P. R. Klatser, N. H. Swellengrebel Laboratório de Higiene Tropical, Instituto Tropical Real, Amsterdã, Holanda.

Eletroforese em gel de poliácridamida- Duodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)

M. leprae sonicado (10 mg/ml) na diluição de 1:4 foi submetido ao SDS-PAGE usando-se 12% de gel separador com 0,1% de SDS em um sistema descontínuo de tampão Tris como descrito por Laemmli et al. (LAEMMLI, 1970). O *M. leprae* sonicado diluído foi tratado com 5% de 2 α -mercaptoetanol e 2% de SDS e aquecido em banho de água a 100°C durante 4 minutos.

Uma mistura de proteínas pré-coradas consistindo de fosforilase B (94 kDa), soro albumina bovino (67 kDa), ovoalbumina (43 kDa), anidrase carbônico (30.1 kDa), inibidor de tripsina de feijão-soja (20.1 kDa) e -lactolbumina (14.4 kDa) foi usado como marcador (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suécia).

Western Blot

As proteínas de *M. leprae* separadas no gel foram marcadas eletroforicamente (TOWBIN et al., 1979) sobre uma membrana de nitrocelulose usando um Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell System (BioRad Laboratories, Venendaal, Holanda). Depois de marcadas, as tiras de nitrocelulose foram bloqueadas durante 30 minutos com PBS contendo Tween (0.3%) a 37°C. As tiras foram lavadas três vezes por 5 minutos cada com PBS e Tween (0.05%) em temperatura ambiente. A coloração por imunistoquímica foi executada de acordo com as

instruções do fabricante, usando-se o método ImmunoGold Silver, (Amersham Life Science, Amersham, Reino Unido). As tiras foram incubadas com anticorpo primário e 1% SCN diluído a 1:200 em PBS contendo Tween (0.05%) durante 2 horas. A seguir, foram lavadas três vezes por 5 minutos cada com PBS e Tween (0.05%). Subseqüentemente, as tiras foram incubadas em uma solução contendo anticorpo de cabra anticamundongo ligado em ouro e anticorpo monoclonal anticeelho ligado em ouro (AuroProbe BL plus, Janssen Life Science, Geel, Bélgica) diluído a 1:100, Gelatina (1:20) e PBS com Tween 0.05% durante 2 horas. As tiras foram novamente lavadas três vezes por 5 minutos cada com PBS e Tween (0.05%). A seguir, foram lavadas durante 2 minutos em água destilada. Finalmente, volumes iguais de realçadores (Amersham Life Science, Amersham, Reino Unido) e iniciadores (Amersham, Life Science, Amersham, Reino Unido) foram misturados e adicionados às tiras para aumentar o sinal do ouro. Reações ocorreram, entre 15-20 minutos. A seguir, as tiras foram lavadas três vezes por 10 minutos cada, em água destilada, e foram secas com papel de filtro.

RESULTADOS

A. Especificidade dos anticorpos anti-HSPs

Imunistoquímica

A reatividade no granuloma e na epiderme em biópsias de pele dos cinco pacientes hansenianos MB que usaram as diluições ótimas dos anticorpos são mostrados na Tabela 3.

Nenhuma coloração específica dos granulomas foi observada usando-se os MoAbs SPA-820, SPA-815, SPA-810, SPA-800, SPA-830. A intensidade das colorações na epiderme com todos os MoAbs variou de fraca a muito forte.

Anticorpos policlonais com SPA-804, SPA-805 e anticorpos monoclonais com SPA-807 reagiram, especificamente, com determinantes presentes no granuloma. Além disso, as colorações-padrão destes três anticorpos eram idênticas. A epiderme não estava corada com quaisquer destes anticorpos.

Western Blot

A especificidade dos anticorpos anti-HSP humano para reagir com determinantes antigênicos do *M. leprae* foram confirmados pelo Western Blot usando-se *M. leprae* sonicado como antígeno.

Como controle, foram incluídos três MoAbs (F 47-10; F 67-18; F 88-1) que criaram reações contra o HSP-

Tabela 3. Reatividade dos anticorpos em granulomas e epiderme na pele de pacientes hansenianos multibacilares (N=5)

Anticorpos (diluição)	Granuloma	Epiderme & proximidades
SPA 820 (1:500)	+	+/-
SPA 815 (1:4000)	+	++++
SPA 810 (1:500)	+/-	+/-
SPA 830 (1:2000)	-	+++
SPA 800 (1:4000)	+/-	+
SPA 804 (1:4000)	+++	-
SPA 805 (1:4000)	+++	-

Intensidade da coloração: (-) negativo; (+/-) suspeito, (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo; (++++) muito fortemente positivo

65 anti-*M. leprae*, (KOLK et al., 1984) e que reagiram especificamente com o granuloma e não com a epiderme.

Análise do imunoblot demonstrou que anticorpos policlonais SPA-804, SPA-805 e os MoAbs SPA-807, F 47-10, F 67-18 e F 88-1 reconheciam proteínas do *M. leprae* com uma massa molecular de 65 kDa. Os resultados também indicaram que os MoAbs F 47-10 e F-67-18 tiveram uma reação maior com estas proteínas de 65 kDa do que os MoAbs F 88-1, 807 e os anticorpos policlonais SPA-804 e SPA-805 (Figura 1).

Os MoAbs SPA-820, SPA-815, SPA-810, SPA-800 e SPA-830 não mostraram nenhuma reatividade com proteínas do *M. leprae* no blot (resultado não mostrado).

Baseado nestes achados, os MoAbs SPA-820, SPA-815, SPA-810, SPA-800 e SPA-830 foram excluídos das investigações adicionais.

B. Uma comparação da reatividade dos anticorpos com granulomas de pacientes PB, MB e outras alterações granulomatosas cutâneas.

Imunoistoquímica

Neste estudo dois anticorpos policlonais, anticorpo monoclonal contra HSP-60 e três anticorpos monoclonais contra HSP-65 do *M. leprae* foram selecionados. O objetivo era investigar se granulomas de outras alterações cutâneas como sarcoidose e granuloma anular mostravam padrões semelhantes aos granulomas T e V.

Os resultados estão demonstrados na Tabela 4. Pode ser visto que as colorações específicas dos granulomas foram observadas em todas as seções de pele com hanseníase, com todos os anticorpos usados.

Nos quatro casos PB, todos os anticorpos marcaram células, especialmente no centro do granuloma. A coloração com o MoAb contra o marcador CD68 de macrófago também foi limitada às células localizadas na mesma área (Figura 2).

A coloração dos granulomas de pacientes PB e MB nas cortes de pele com MoAb anti-HSP 60, anticorpos policlonais e com MoAb F 88-1 era semelhante (de moderada a fortemente positiva) (Figura 3).

Reatividade para os MoAbs F 47-10 e F 67-18 em lesões de PB resultaram entre duvidosas e positiva fraca. Em contraste, o mesmo MoAb reagiu com intensidade forte até fortemente positiva nas lesões dos pacientes MB.

Os resultados, como resumidos na Tabela 5, demonstram que granulomas de outras alterações cutâneas apresentam reações semelhantes aos padrões observados na hanseníase. Um padrão representativo é mostrado na Figura 4.

C. Detecção *in situ* de determinantes antigênicos da HSP-60 em macrófagos de PB e MB e outras alterações cutâneas granulomatosas.

Imunoistoquímica – dupla coloração

A dupla coloração foi feita para demonstrar que os antígenos reconhecidos por ambos os MoAbs anti-HSP-60 humano, anti-HSP-65 do *M. leprae* e anticorpos policlonais estão (principalmente) localizados nos macrófagos e demonstraram que estes MoAbs anti-HSP-60 humano, anti-HSP-65 do *M. leprae* e os anticorpos policlonais podem reagir com os mesmos antígenos.

Tabela 4. Coloração simples do granuloma em cortes de pele de pacientes hansenianos paucibacilares (N=4) e multibacilares (N=5) usando anticorpos contra HSP 60 e anticorpos monoclonais contra a HSP-65 do *M. leprae*.

Paciente	FFW (B.I.)	anti CD 68	SPA 804/805/807	F 47-10	F 67-18	F 88-1
Paucibacilar						
TT 182-27	0	+++	+++	+ /+++	+	+++
RR-BT 95522	0	+++	+++	+	+/-	+++
BT 219-4	0	+++	++	+	+/-	++
BT 88-6	0	+++	+++	++	+	+++
Multibacilar						
BL 250-11	3+	+++	+++	+++	+++	+++
BL 22595	3+	+++	++	++ /+++	++ /+++	+++
LL 3595	4+	+++	+++	++++	++++	++++
BL 152-15	2+	++	+++	++	++	+++
BL 19595	3+	+++	+++	++	++	++++

Intensidade da coloração: (-) negativo; (+/-) suspeito, (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo; (++++) muito fortemente positivo

Índice baciloscópico (IB) pela coloração FFW: (1+) 1 a 10 bacilos em 100 campos; (2+) 1 a 10 bacilos em 10 campos; (3+) 1 a 10 bacilos em meio campo; (4+) 10 a 100 bacilos em meio campo; (5+) 100 a 1000 bacilos em meio campo; (6+) muitos agrupamentos ou acima de 1000 bacilos em meio campo.

Tabela 5. Coloração simples em cortes de pele de outras doenças granulomatosas (N=5) usando anticorpos contra a HSP 60 e anticorpos monoclonais contra a HSP-65 do *M. leprae*.

Paciente	anti CD68	SPA 804/805/807	F 47-10	F 67-18	F 88-1
SA 173-24	+++	+++	+	+	+++
GA 157-01	+++	++	+/-	-	+++
NL 101-27	+++	++	+/-	+/-	+++
GA 288-14	+++	++	+/-	-	+++
LS 23595	+++	++	+/-	-	+++

Intensidade da coloração: (-) negativo; (+/-) suspeito, (+) fracamente positivo; (++) moderadamente positivo; (+++) fortemente positivo; (++++) muito fortemente positivo.

SA: Sarcoidose; GA: Granuloma Anular; NL: Necrobiose Lipóidica; LS: Leishmaniose cutânea.

Tabela 6. Dupla coloração, imunohistoquímica.

Paciente	F88-1 /CD68	F47-10 /CD68	F67-18 /CD68	SPA807 /CD68	F88-1 /SPA807
Paucibacilares					
RR 95522	+ (70-80)	+ (60-70)	-	+ (60-70)	+ (70-80)
BT 88-6	+ (60)	+ (40)	-	+ (60)	+ (50-60)
TT 182-26	+ (60)	+ (40-50)	-	+ (60)	+ (50-60)
Multibacilares					
ENL 26995	+ (50-60)	+ (50)	+ (5-10)	+ (60)	+ (60-70)
BL 23595	+ (50-60)	+ (50-60)	+ (<5)	+ (60)	+ (70)
LL 22595	+ (40-50)	+ (50-60)	+ (20-30)	+ (50)	+ (50-60)
Granuloma anular					
GA 288-14	+ (50)	+ (40)	-	+ (50-60)	+ (50)

Graus: + positivo; - negativo
(%) porcentagem estimada de células duplamente coradas no granuloma.

A combinação de MoAbs usada na dupla coloração foi a seguinte: F 88-1/anti-CD68, F 47-10/anti-CD68, F 67-18/anti-CD68, SPA-807/anti-CD68 e F 88-1/SPA 807.

Uma biópsia de granuloma anular, duas de hanseníase PB e duas de MB, apresentavam dupla coloração. Os resultados são mostrados na Tabela 6.

Os MoAbs F 88-1, F 47-10 e SPA-807 combinados com o MoAb anti-CD68 mostraram muitas células com dupla coloração no granuloma em todas as seções de pele de pacientes com hanseníase e outras alterações granulomatosas.

Com o MoAbs F 67-18 e anti-CD68, as células com dupla coloração foram vistas somente nos MB. Nos pacientes PB e nos cortes com granuloma anular não havia nenhuma coloração com MoAb F 67-18. Estes resultados eram compatíveis com os resultados obtidos na simples coloração com o mesmo MoAb.

Em todas as seções de pacientes PB e MB coradas com a combinação F 88-1 e SPA-807, foram observadas células coradas pela dupla coloração (Figura 5). Usando-se a mesma combinação de MoAbs, no método da dupla coloração foram vistos padrões similares ao da hanseníase PB no granuloma anular.

DISCUSSÃO

Há mais de duas décadas os imunologistas começaram a investigar o papel das Proteínas do Choque Térmico na patogênese da hanseníase. Antígenos altamente imunodominantes do *M. leprae* foram reconhecidos como homólogos das proteínas de estresse (COHEN et al., 1991; KAUFMANN, 1990; YOUNG et al., 1987). Mais importante é que, as HSPs do *M. leprae* mostraram até 50% de identidade na seqüência de genes com seus análogos humanos (DUDANI et al., 1989; GARSIA et al., 1989). O soro dos pacientes infectados reage intensamente, especialmente contra os determinantes antigênicos da HSP-60 (YOUNG et al., 1987). Uma subclasse de linfócito T, as células T γ/δ são capazes de reconhecer especificamente os determinantes antigênicos da molécula HSP-65 do *M. leprae*. A ativação de tais células resulta na liberação de citocinas e recrutamento de linfócitos mais específicos e macrófagos para a área infectada (HAREGEWOIN et al., 1991; MODLIN et al., 1989). Sabe-se que a agregação de macrófagos infectados e ativados e células T levam à formação de um, assim chamado, "granuloma" que causa dano tecidual (pele e nervo), quadro histopatológico

característico da hanseníase. Contudo, os exatos mecanismos que levam a ativação e agregação dessas células em áreas com lesão não são bem compreendidos. Além do mais, os antígenos envolvidos nesses processos ainda permanecem desconhecidos especialmente quando o próprio *M. leprae* muitas vezes pode não ser detectado. Visto que as seqüências de genes das HSPs do *M. leprae* e do homem são tão semelhantes, é tentador postular que a autoimunidade contra as HSPs humanas está envolvida na formação de granuloma e o subsequente dano tecidual na hanseníase.

Continuando o trabalho anterior para demonstrar a existência de semelhanças entre o *M. leprae* e os antígenos cutâneos humanos, este estudo foi realizado usando-se técnicas imunistoquímicas com uma e dupla coloração e a técnica de Western Blot para obter mais suporte para essa opinião de que pode haver semelhanças entre os determinantes antigênicos da HSP-60 humana e a HSP-65 do *M. leprae*.

Na primeira parte deste estudo, foi investigado se determinantes antigênicos das HSPs poderiam ser detectadas no granuloma da pele da hanseníase multibacilar, usando-se anticorpos mono e policlonais contra HSPs. Foi sugerido (COLSTON et al., 1989; POLLA, 1991; 1991) que o processo de infecção "estressa" não somente o bacilo invasor, mas também as células do hospedeiro infectado (isto é, macrófagos, células de Schwann). Isso leva a uma super produção de HSPs nessas células durante a infecção. Por isso pode-se esperar que as HSPs ou produzidas pelos macrófagos ou pelo *M. leprae* ou por ambos são expressas nos macrófagos. Focalizou-se a atenção, especificamente nos macrófagos porque, ao lado de sua função como células apresentadoras de antígeno, os macrófagos ativadas parecem realizar importantes funções "efetoras" levando à lise celular. Além do mais, os macrófagos representam a maioria da população celular dentro de um granuloma, ou como células epitelióides ou como células gigantes na hanseníase paucibacilar ou como "células espumosas" histiocíticas na hanseníase multibacilar.

No presente estudo, o achado de coloração positiva com os anticorpos monoclonais anti-HSP 70 (SPA-820, SPA-815 e SPA-810) na epiderme foi relatado anteriormente por vários investigadores (BOEHNCKE et al., 1994; EDWARDS et al., 1991; TRAUTINGER et al., 1993). Khanolkar-Young et al., 1994, relataram que a HSP-70 estava expressa mais significativamente no granuloma na pele e no tecido nervoso de pacientes com hanseníase sofrendo uma RR do que naqueles pacientes sem uma RR. Usando, contudo, os mesmos MoAbs (SPA-810 e SPA-820), nós não conseguimos observar qualquer

diferença na coloração do granuloma na pele nem na hanseníase PB e MB e nem na RR. Recentemente, utilizando imunistoquímica, Aroni et al.(1996) observaram uma expressão de HSP-70 significativamente mais alta no granuloma da pele da hanseníase virchoviana que no granuloma na pele da hanseníase tuberculóide. Contudo, o anticorpo policlonal contra HSP-70 usado em seu estudo também reagiu com a epiderme, por isso a capacidade deste anticorpo policlonal de reagir especificamente com determinante da HSP-70 é um ponto de discussão.

Os MoAbs anti HSP-27 e anti HSP-90 também falharam em corar, especificamente, o granuloma. Isso pode indicar que HSP-27 e HSP-90 não são expressos em células dentro do granuloma. Há necessidade ainda de ser estabelecido se este achado também indica que a HSP-27 e/ou HSP-90 não tem importância imunológica em hanseníase.

Por outro lado, os três anticorpos mono e policlonais contra HSP-60 (SPA-804, SPA-805 e SPA-807) coraram o granuloma de maneira intensa, enquanto que a epiderme era negativa indicando que os determinantes antigênicos presentes dentro do granuloma tinham reagido especificamente com esses anticorpos.

Com o Western Blot foi observado que o SPA-804, SPA-805 e SPA-807 reagem com as proteínas do *M. leprae* de peso molecular 65 kDa. Foram incluídos como controle, três MoAbs (F47-10, F67-18 e F88-1) cada um reagindo com um diferente determinante antigênico no antígeno de 65 kDa do *M. leprae*. Nesses blots esses três MoAbs também reagem com uma proteína de 65 kDa do *M. leprae* em um padrão que era semelhante aquele relatado anteriormente por vários outros pesquisadores (BUCHANAN et al., 1987; THOLE et al., 1987). Os anticorpos monoclonais contra HSP-70, HSP-27 e HSP-90 humanos não mostraram nenhuma reação significativa nos blots, confirmando os achados da imunistoquímica. Isto sugeriu que a proteína 65 kDa do *M. leprae* pertence à família da HSP-60 (DUDANI et al., 1989). Por isso, não é surpreendente que os anticorpos contra a HSP-60 e os anticorpos contra a proteína HSP-65 do *M. leprae* produzam uma banda de padrão semelhante no Western Blot. Contudo, notou-se que as bandas no nível de 65 kDa produzidas pelo MoAb SPA-804 e os MoAbs SPA-807 e F88-1 eram menos proeminentes do que aquelas que eram produzidas pelos MoAbs F47-10 e F67-18 que pareciam ser mais específicas do *M. leprae*.

No segundo estudo os padrões de coloração dos anticorpos anti HSP-60 foram comparados com aqueles dos anticorpos anti HSP-65 do *M. leprae* usando cortes em criostato de pacientes com hanseníase PB e MB e

outras doenças cutâneas granulomatosas. Este estudo também demonstrou semelhanças entre HSP-60 humano e HSP-65 do *M. leprae*. Os anticorpos policlonais SPA-804 e SPA-805 e o MoAbs SPA-807 e F88-1 mostraram coloração muito semelhantes do granuloma, com relação à intensidade da coloração e à localização das células positivas, na hanseníase PB e MB, bem como em outras doenças cutâneas granulomatosas. Colorações positivas pela imunoperoxidase do granuloma em lesões de sarcoidose, na pele e em tecidos pulmonares, usando anticorpo anti HSP-60 foram demonstradas anteriormente (STATON et al., 1995). O nosso achado de que os anticorpos anti-HSP também coravam o granuloma em cortes de pele de granuloma anular, necrobiose lipóidica e leishmaniose cutânea pode indicar que a alta expressão de HSPs poderia representar um aspecto característico de qualquer doença inflamatória granulomatosa (infeciosa e não infecciosa).

Ao contrário, os MoAbs F47-10 e F67-18 coraram os granuloma de hanseníase MB intensamente, mas não coraram ou só coraram fracamente o granuloma de hanseníase PB e de outras doenças granulomatosas cutâneas.

Por um lado, esses achados junto com as diferenças na intensidade da reatividade dos MoAbs no *blot* mostraram que o MoAb F88-1 provavelmente tinha reagido cruzadamente com determinantes antigênicos que não eram específicos para o *M. leprae*, mas são comuns aos determinantes na HSP-60 humana. Por outro lado, os resultados do Western Blot também indicaram que os MoAbs F47-10 e F67-18 reagiram com regiões na proteína 65 kDa do *M. leprae* que são provavelmente espécie-específicas para o *M. leprae* (resultando em uma reatividade mais intensa) e que, por isso, compartilham menos semelhanças com HSP-60. Desta maneira, seria interessante realizar estudos de absorção utilizando-se proteína HSP-60 recombinante ou purificada e seus peptídeos individuais para definir exatamente os determinantes antigênicos reagentes (ANDERSON et al., 1988; MEHRA et al., 1986; THOLE et al., 1988).

Os métodos de dupla coloração revelaram não

somente que era muito provável que o MoAb da HSP-60 humano (SPA-807) e os anticorpos monoclonais HSP-65 do *M. leprae* (F88-1) reagiam com as mesmas “estruturas”, mas que essas “estruturas” eram na maior parte das vezes expressas em macrófagos. Entretanto, mais, estudos, são necessários para elucidar a ligação entre as HSPs e os macrófagos e o possível papel dos determinantes antigênicos compartilhados pelas HSPs de diferentes origens em gerar uma resposta (auto)imune levando à formação de granulomas na hanseníase e outras doenças granulomatosas. A sarcoidose, por exemplo, é vista por alguns como a forma tuberculóide da tuberculose (ROOK et al., 1992; STANFORD, 1994). A necrobiose lipóidica é freqüentemente relacionada à diabetes, uma condição em que uma semelhança antigênica entre HSP-65 bacteriana e HSP-60 humana parece desempenhar um papel importante (HORVATH et al., 2002). O interessante é notar os recentes progressos no entendimento da arteriosclerose na qual a autoimunidade contra HSP-60 humana, induzida pela infecção parece também desempenhar uma parte importante (PERSCHINSKA et al., 2003).

Contudo, os resultados deste estudo mostraram que o conceito de autoimunidade em hanseníase que pode ser desencadeado com base nas semelhanças em HSPs entre o *M. leprae* e o homem é atraente e merecedor de mais investigações.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos ao Prof. Dr. R. Lai a Fat, do Hospital Acadêmico Paramaribo do Suriname por providenciar biópsias de pele de hanseníase; Dr. P.R. Klatser, do N.H. Swellengrebel Laboratório de Higiene Tropical, Instituto Tropical Real, Amsterdã por providenciar os *M. leprae* sonificados e Sr. J. v.d. Stek, do Hospital de Dijkzigt Rotterdam, por preparar as figuras. Este estudo foi apoiado financeiramente pela Netherlands Leprosy Relief Association, Bethesda Foundation e QM Gastmann Wichers Stichting.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANDERSON, D.C.; BARRY, M.E.; BUCHANAN, T.M. Exact definition of species-specific and cross-reactive epitopes of the 65-kilodalton protein of *Mycobacterium leprae* using synthetic peptides. *J. Immunol.* n.141, p. 607-613, 1988.
- 2 ARONI, K.; KONTOCHRISTOPOULOS, G.; LIOSSI, A.; PANTELEOS, D.; DAVARIS, P. Immunohistochemical study of HSP-70 in two basic leprosy groups. *Arch. Dermatol.* v. 288, p. 252-254, 1996.
- 3 BOEHNCKE, W.H.; DAHLKE, A.; ZOLLNER T.M.; STERRY, W. Differential expression of heat shock protein 70 (HSP 70) and heat shock cognate protein (HSC 70) in human epidermis. *Arch. Dermatol.* v. 287, p. 68-71, 1994.
- 4 BOOG, C.J.P.; De GRAEFF-MEEDER, E.R.; LUCASSEN M.A.; VAN DER ZEE, R.; VOORHORST-OGINK, M.M.; VAN KOOTEN, J.S.; GEUZE, H.J., VAN EDEN, W. Two monoclonal antibodies generated against human HSP60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis. *J. Exp. Med.*, v.175, p. 1805-1810, 1992.
- 5 BUCHANAN, T.M.; NOMAGUCHI, H.; ANDERSON, D.C.; YOUNG, R.A.; GILLIS, T.P.; BRITTON, W.J.; IVANYI, J.; KOLK, A.H.J.; CLOSS, O.; BLOOM, B.R.; MEHRA, V. Characterization of antibody-reactive epitopes on the 65 kilodalton protein of *Mycobacterium leprae*. *Infect. Immun.*, v.55, p. 1000-1003, 1987.
- 6 CATTORETTI, G.; BERTI, E.; SCHIRO, R.; D'AMATO, L.; VALEGGIO, C.; RILKE, F. Improved avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) staining. *Histol. J.*, v. 20, p. 75-80, 1988.
- 7 CIOCCA, D.R.; ADAMS, D.J.; BJERCKE, R.J.; EDWARDS, D.P.; MCGUIRE, W.L. Immunohistochemical detection of an estrogen-regulated protein by monoclonal antibodies. *Cancer Res.*, v. 42, p. 4256-4258, 1982.
- 8 COHEN, I.R.; YOUNG, D. Autoimmunity, microbial immunity and the immunological homunculus. *Immunol. Today*, v. 12, p. 105-110, 1991.
- 9 COLSTON, M.J.; LAMB, F.I. Molecular Biology of the Mycobacteria. *Lepr. Rev.*, v. 60, p. 89-93, 1989.
- 10 DALMAN, F.C.; BRESNICK, E.H.; PATEL, P.D.; PERDEW, G.H., WATSON, J.; PRATT, W.B. Direct evidence that the glucocorticoid receptor binds to HSP90 at or near the termination of receptor translation in vitro. *J. Biol. Chem.*, v. 264, p. 19815-19821, 1989.
- 11 DAMIAN, R.T. Molecular mimicry: Antigen sharing by parasite and host and its consequences. *The American Naturalist*, v.98, p. 129-149, 1964.
- 12 DAS, P.K.; TULP, A. Use of unit gravity sedimentation chamber for the purification of *M. leprae*. *Ann. Microbiol. (Paris)*. v.133B, p. 389-400, 1982.
- 13 DUDANI, A.K.; GUPTA, R.S. Immunological characterization of a human homolog of the 65 - kilodalton mycobacterial antigen. *Infect. Immun.*, v.57, p.2786-2793, 1989.
- 14 EDWARDS, M.J.; MARKS, R.; DYKES, P.J.; MERRETT, V.R.; MORGAN, H.E.; O'DONOVAN, M.R. Heat shock proteins in cultured human keratinocytes and fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.*, v.96, p. 392-396, 1991.
- 15 GARSIA, R.J.; HELLQVIST, L.; BOOTH, R.J.; RADFORD, A.J.; BRITTON, W.J.; ASTBURY, L.; TRENT, R.J.; BASTEN, A. Homology of the 70-kilodalton antigens from *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium bovis* with the *Mycobacterium tuberculosis* 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infect. Immun.*, v.57, p.204-212, 1989.
- 16 HAREGEWOIN, A.; SINGH, B.; GUPTA, R.S.; FINBERG, R.W. A mycobacterial heat shock protein-responsive gamma delta T-cell clone also responds to the homologous human heat shock protein: a possible link between infection and autoimmunity. *J. Infect. Dis.*, v.163, p. 156-160, 1991.
- 17 HORVATH, L.; CERVENAK, L.; ORLOSZLAN, M.; PROHASZKA, Z.; URAY, K.; HUDESZ, F.; BARANYI, E.; MADACSY, L.; SINGH, M.; ROMICS, L.; FUST, G.; PANCEL, P. Antibodies against different epitopes of heat shock protein 60 in children with type I diabetes mellitus. *Immunol. Lett.* v.80, p. 155-162, 2002.
- 18 KAUFMANN, S.H.E. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol. Today*, v. 11, p. 129-136, 1990.
- 19 KHANOLKAR YOUNG, S.; YOUNG, D.B.; COLSTON, M.J.; LOCKWOOD, D.N. Nerve and skin damage is associated with increased intralosomal heat shock protein. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 96, p. 208-213, 1994.
- 20 KOLK, A.H.J.; HO, M.L.; KLATSER, P.R. Production and characterization of monoclonal antibodies to *M. tuberculosis*, *M.bovis* BCG and *M. leprae*. *Clin. Exp. Immunol.*, v. 58, p. 511-522, 1984.
- 21 LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970.
- 22 MAYTIN, E.V. Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones: Implications for Adaptive Responses in the Skin. *J. Invest. Dermatol.*, v. 104, p. 448-455, 1995.
- 23 MEHRA, V.; SWEETSER, D.S.; YOUNG, R.A. Efficient mapping of protein antigenic determinants. *Proc. Natl. Acad. Sc.*, v. 83, p. 7013-7017, 1986.
- 24 MILLER, S.G.; HUETTEL, M.D. Mitochondrial biogenesis during spermatogenesis in *Heliothis virescens*, *H. subflexa* and their male-sterile back-cross hybrids. *Archs. Insect. Biochem.*, v. 3, p. 363-380, 1986.

- 25 MODLIN, R.L.; PIRMEZ, C.; HOFMAN, F.M.; TORIGIAN, V.; UYEMURA, K.; REA, T.H.; BLOOM, B.R.; BRENNER, M.B. Lymphocytes bearing antigen specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature.*, v. 339, p. 544-548, 1989.
- 26 NAAFS, B.; KOLK, A.H.J., CHIEN; A., LIEN, R.A.M.; FABER, W.R.; VAN DIJK, G.; KUIJPER, S.; STOLZ, E.; VAN JOOST, T.H. Anti *Mycobacterium leprae* monoclonal antibodies cross-react with human skin: an alternative explanation for the immune responses in leprosy. *J. Invest. Dermatol.*, v. 94, p. 685-688, 1990.
- 27 PERSCHINSKA, H.; MAYO, M. ; MILLONIG, G.; MAYERL, C.,; VAN DER ZEE, R.; MORRISON, S.G., MORRISON, R.P.; XU, Q.; WICK, G. Cross-reactive B-cell epitopes of microbial and human heat shock protein 60/65 in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, v. 23, p. 1060-1065, 2003.
- 28 POLLA, B.S. Heat Shock proteins in host-parasite interactions. *Immunol. Today*, v. 12, p. 38-41, 1991.
- 29 POLLA, B.S. The heat shock response in human phagocytes. *Immunol. Lett.* v.30, p.159-164, 1991.
- 30 PULFORD, K.A.F.; RIGNEY, E.M.; MICKLEM, K.J.; JONES, M.; STROSS, W.P.; GATTER, K.C.; MASON, D.Y. KPI: A new monoclonal antibody that detects a monocyte/macrophage associated antigen in routinely processed tissue sections. *J. Clin. Pathol.*, v. 42, p. 414-421, 1989.
- 31 RAMBUKKANA, A.; DAS, P.K.; KRIEG, S.; YONG, S.; LE POOLE, I.C.,; BOS, J.D. Mycobacterial 65,000 MW heat shock protein shares a carboxy-terminal epitope with human epidermal cytokeratine 1/2. *Immunology*, v. 77, p. 267-276, 1992.
- 32 ROOK, G.H.; STANFORD, J.L. Slow bacterial infections or autoimmunity. *Immunol. Today.*, v. 13, p. 160-164, 1992.
- 33 STANFORD, J.L. The history and future of vaccination and immunotherapy in leprosy. *Trop. Geogr. Med.*, v. 46, p. 93-107, 1994.
- 34 STATON, J.M.; DENCH, J.E.; CURRIE, B.; FITZPATRICK, D.R.; HIMBECK, R.P.; ALLEN, R.; BRUCE, J.; ROBINSON, B.W.S.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Expression and immune recognition of stress proteins in sarcoidosis and other chronic interstitial lung diseases. *Immunol. Cell. Biol.*, v. 73, p. 23-32, 1995.
- 35 THOLE, J.R.; KEULEN, W.J.; KOLK, A.H.J.; GROOTHUIS, D.G.; BERWALD, L.G.; TIESJEMA, R.H.; VAN EMBDEN, J.D.A. Characterization, sequence determination and immunogenicity of a 64-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG expressed in *Escherichia coli* K-12. *Infect. Immun.*, v. 55, p. 1466-1475, 1987.
- 36 THOLE, J.R.; VAN SCHOOTEN, W.C.A.; KEULEN, W.J.; HERMANS, P.W.M.; JANSON, A.A.M.; DE VRIES, R.R.P.; KOLK, A.H.J.; VAN EMBDEN, J.D.A. Use of recombinant antigens expressed in *Escherichia coli* K-12 to map B-cell and T-cell epitopes on the immunodominant 65-kilodalton protein of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect. Immun.*, v. 56, p. 1633-1640, 1988.
- 37 TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Sci.*, v. 76, p. 4350-4354, 1979.
- 38 TRAUTINGER, F.; TRAUTINGER, I.; KINDAS-MUGGE, I.; METZE, D. LUGER, T.A. Human Keratinocytes in vivo and in vitro constitutively express the 72-kD heat shock protein. *J. Invest. Dermatol.*, v. 101, p. 334-338, 1993.
- 39 VAN DEN AKKER, T.H.; NAAFS, B.; KOLK, A.H.J.; DE GLOPPER-VAN DER VEER, E.; CHIN, A LIEN; R.A.M.; VANJOOST, T.H. Similarity between mycobacterial and human epidermal antigens. *Br. J. Dermatol.*, v. 127 p. 352-358, 1992.
- 40 WEBB, R.; REDDY, K.J.; SHERMAN, L.A. Regulation and sequence of the *Synechococcus* sp. strain PCC 7942 groESL operon, encoding a cyanobacterial chaperonin. *J. Bacteriol.*, v. 172, p. 5079-5088, 1990.
- 41 YOUNG, D.B.; IVANYI, J.; COX, J.H.; LAMB, J.R. The 65 kDa antigen of mycobacteria- A common bacterial protein? *Immunol. Today.*, v. 8, p. 215-219, 1987.