

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

PROTEÍNA-C-REATIVA

E

FATOR DE NECROSE TUMORAL NA HANSENÍASE

Norma Tiraboshi Foss

*PROTEÍNA-C-REATIVA E
FATOR DE NECROSE TUMORAL NA HANSENÍASE*

NORMA TIRABOSHI FOSS

Tese apresentada a Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
Concurso a *Docência Livre* junto ao
Departamento de Clínica Médica.

*Aos meus pais, pela sabedoria com que sempre
respeitaram minhas opções.*

*Ao Foss e às nossas TRÊS MARIAS (PAULLA,
CRISTINA E CAROLINA), a constelação que ilumina
os meus dias.*

AGRADECIMENTOS

.Aos DOENTES DE HANSENÍASE que com tanta paciência e humildade colaboraram neste estudo e me confiaram os segredos de seus sofrimentos, deixando-me a consciência do muito que há para ser feito.

.Ao Prof. Dr. LUIS MARINO BECHELLI, o grande MESTRE que tão cuidadosamente tem me acompanhado desde os primeiros passos na Dermatologia, com sua presença amiga apoiando-me em todos momentos desta jornada. Aliado aos seus profundos conhecimentos científicos tem contribuído consideravelmente em minha formação profissional e humana.

.Ao Prof. Dr. PAULO MÚCIO GUIMARÃES PAGNANO, pela dedicação e estímulo durante o desenvolvimento do trabalho.

.Ao Prof. Dr. EDUARDO BRANDT DE OLIVEIRA, que muito cuidadosa e gentilmente preparou a proteína-C-reativa, oferecendo-me a condição fundamental para realização do projeto.

.Ao Prof. Dr. CELIO LOPES SILVA, pelo incentivo, apoio e preciosa colaboração tornando viável a dosagem do fator de necrose tumoral.

.Ao Prof. Dr. GERSON MUCILO pela orientação minuciosa da análise estatística.

. As colegas da Disciplina de Dermatologia, Profas. Dras. EMILIA SIMÃO TRAD, ANA MARIA FERREIRA ROSELINO e ANA MÁRCIA DE ALMEIDA, pelo apoio e amizade durante estes anos.

. À Bióloga MARIA APARECIDA NUNES FERREIRA, companheira que tanto ajudou na criação do Laboratório de Dermatologia, pelo carinho com que executou todas as etapas e técnicas deste projeto.

. À Bióloga DENISE : RUFATO, pelo companheirismo e sensibilidade com

que tem colaborado nas etapas finais deste trabalho.

. À Sr. NATALIA CASTILHO BARBIERI, pela amizade, cuidado e carinho com a manutenção de nossos materiais.

. Ao Sr. LUIS ROBERTO SA DA COSTA pela colaboração na coleta dos soros de proteína-C-reativa.

. Ao Sr. JOSÊ SERMENATI FILHO, pela colaboração na purificação da proteína-C-reativa.

. A Sra. MARIA INÊS DA SILVA ANCF,SCHI, pela dosagem nefelométrica da proteína-C-reativa.

. A Profa. RUTH DALL'AGLIO FOSS, pela cuidadosa revisão ortográfica.

. Ao Sr. ANTONIO MESQUITA NETO, pela dedicação nos serviços datilográficos.

. Ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO - Proc. No. 300187/87-4, que colaborou para realização do projeto.

ÍNDICE

INTRODUÇÃO	1
DOENTES E CONTROLES - MÉTODOS	11
- doentes e controles.....	12
- métodos	19
RESULTADOS	48
DISCUSSÃO	84
RESUMO E CONCLUSÕES	100
REFERÊNCIAS	105

INTRODUÇÃO

O espectro de manifestações clínicas da hanseníase está diretamente relacionado à resistência do hospedeiro ao M.leprae. Nos extremos, situam-se as formas polares (Rabello, 1936) tuberculóide (HT) e virchowiana(HV), com diferenças clínicas, histológicas, bacteriológicas, imunológicas e evolutivas marcantes. A forma tuberculóide apresenta uma ou poucas lesões bem delimitadas, nas quais se observa, ao exame histológico, granuloma tuberculóide com grande número de linfócitos, células epitelióides e histiocitárias, onde raramente são encontrados bacilos intracelulares (Bechelli & Rotberg, 1951). A quantidade de anticorpos humorais é normal ou diminuída e a imunidade celular geralmente está aumentada.

Na forma virchowiana as lesões têm limites imprecisos e tendem a disseminar-se. A histologia revela infiltrado inflamatório com poucos ou raros linfócitos e numerosos macrófagos contendo quantidade variáveis de bacilos, até globias, constituindo as células de Virchow. Há elevada quantidade de imunoglobulinas e deficiência de imunidade celular. Os bacilos são tão

numerosos que nas biopsias de pele podem ser encontrados ao redor de 10^{10} bacilos/g. de tecido (Bloom, 1986), tendendo a invadir vasos sanguíneos e a produzir bacteremia assintomática, porém contínua. E a forma progressiva da doença na qual as lesões podem evoluir disseminando-se por todo organismo (Bechelli & Curban, 1988).

Esta disseminação reflete depressão ou falta de imunidade celular do hospedeiro ao M. leprae a qual poderia estar associada à deficiência de resposta linfoproliferativa na presença do bacilo (Godal et alii, 1971, Bjune et alii, 1976, Menzel et alii 1979 a e b, Pagnano et all, 1982, Tiraboschi-Foss et alii, 1990), ou b. supressão da resposta imune por células T supressoras (Mehra et alii, 1980).

No pólo tuberculóide a resposta linfoproliferativa ao M.leprae está exacerbada (Godal et all, 1971) e há evidência de que a eficiência da Imunidade celular seja a principal causa das lesões (Godal, 1984).

O tratamento com drogas bactericidas é fundamental para o controle epidemiológico da hanseníase nos doentes virchowianos. Quando se inicia a terapêutica, freqüentemente ocorre exacerbação do quadro clínico com comprometimento do estado geral, febre alta, acometimento neurológico (neurites), edema, eritema e calor nas articulações (artrite), e nódulos cutâneos eritematosos e dolorosos à palpação, caracterizando a reação hansênica (Bechelli & Rotberg, 1951). Nesta encontram-se alterações laboratoriais particulares: aumento da velocidade de hemossedimentação, aumento das proteínas da reação inflamatória aguda (mucoproteínas, proteína- C-reativa) e eventualmente, alteração da função renal.

A hanseníase tuberculóide em reação é, em geral, polimorfa.

Manifesta-se por máculas eritemato-escamosas, máculo-pápulas, pápulas, tubérculos e nódulos, cor vermelho arroxeadado ou francamente arroxeadado. Geralmente há infiltração das lesões pré-existentes, mas podem surgir lesões novas (Bechelli & Curban, 1988).

As reações hansênicas, que podem ser do tipo I (hipersensibilidade tardia) ou do tipo II (por imunocomplexo circulante), representam para o doente um estado temporário de exacerbação da moléstia; são debilitantes e apresentam-se em surtos recorrentes durante o tratamento (Pearson, 1986). A involução da reação e a resposta terapêutica podem ser acompanhadas, clínica e laboratorialmente, pela queda dos níveis de proteína-C-reativa, que são elevados na fase aguda (3+ e 4+) e negativos com o controle da reação inflamatória (Languillon, 1986).

Sabe-se que inflamação é basicamente uma resposta sistêmica do organismo à infecção ou lesão tecidual. Os estágios iniciais desta resposta são conhecidos como fase aguda, que é caracterizada, em parte, por um dramático aumento na produção e subsequente acréscimo da concentração sanguínea de um grupo de proteínas conhecidas como proteínas da fase aguda (Zahedi et alii, 1989).

Proteína-C-reativa (PCR) é um dos elementos da fase aguda e sua concentração sérica pode aumentar de níveis inferiores a 1,0mg/dl a 400mg/dl, nas primeiras 24-48 horas de reação inflamatória (Pepys et alii, 1983). A PCR é constituída de até cinco subunidades de 23,5 KDa cada (206 aminoácidos), ligadas não covalentemente, com massa molecular total de 117000 (Oliveira et alia 1977; Gewurz, 1982; Zahedi et alii, 1989).

Pouco se sabe sobre a participação da proteína-C-reativa nas

reações imunológicas presentes na hanseníase. É conhecido que a concentração de PCR é elevada em doenças infecciosas (Kaplan & Volanakis, 1974; Zahedi et alii, 1986; Balou et alii, 1989) e que, na hanseníase virchowiana, principalmente nos estados reacionais, está consideravelmente aumentada (Languillon, 1986).

Segundo Gotschlich (1989), a proteína-C-reativa tem sido associada a várias funções biológicas destacando-se entre elas:

- a) *Capacidade reconhecer o "alvo" e centralizar os mecanismos de defesa de modo semelhante aos anticorpos.*
- b) *Modificar o comportamento de células efectoras, principalmente leucócitos polimorfomucleares, linfócitos, monócitos e plaquetas.*
- c) *Pode ser fracionada por enzimas proteolíticas, liberando peptídeos ativos que poderiam, também, exercer outras funções biológicas.*

Além destas atividades, PCR ativa a via clássica do complemento ligando-se b. fração Clq (Kaplan & Volanakis, 1974); e, ainda, liga-se a subpopulações de linfócitos que contenham receptor Fc da imunoglobulina G (James et al., 1981 a e b), assim como a monócitos (Gewurz, 1982; Zeller et alii, 1989) e a neutrófilos (Mullex & Fehr, 1986; Buchta et al., 1987). Estes resultados sugerem que PCR interage com uma variedade de células sanguíneas, através de receptores específicos ("specific binding sites") de células fagocitárias, desempenhando a função de fator de opsonização inespecífico da reação inflamatória (Balou et alii, 1989).

Bullock, (1978) descreveu que concentrações elevadas de PCR no

soro de virchowianos poderiam inibir a blastogênese de linfócitos, sugerindo que PCR possui atividade imunossupressora ou imunorreguladora da resposta linfoproliferativa.

Como é conhecido que em doentes virchowianos, especialmente os reacionais, os níveis séricos de PCR estão elevados, poder-se-ia supor que a depressão de resposta imune celular destes doentes esteja associada à atividade imunossupressora da proteína-C-reativa, atuando como fator sérico inibidor da blastogênese.

A presença de fatores Inibitórios da blastogênese no soro de virchowianos foi assinalada em investigações de Nelson et alia (1971); Bullock & Fasal (1971); Pagnano (1974); Beiguelman et alii (1975) e destacada por Bjune et alii (1976), demonstrando que plasma de virchowianos causava depressão da atividade blástica de linfócitos de doentes e de indivíduos não afetados. Esta depressão foi associada a fatores existentes no plasma do doente. A extensão com que estes fatores séricos ou plasmáticos deprimem a resposta linfoproliferativa de virchowianos permanece ainda desconhecida.

Por outro lado, existem atualmente evidências experimentais sugerindo que a produção de PCR seria induzida por citocinas, liberadas por macrófagos ativadas como a interleucina-1 (IL1), o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-6 (IL6) ou IL1 e 11.6 associadas (Kushner et alit, 1989; Taylor et alii, 1989). Estas citocinas, exercendo função reguladora, atuam diretamente sobre os hepatócitos induzindo a síntese de proteína-C-reativa (Yamada et alai, 1990).

Deve ser lembrado que as citocinas são peptídeos mediadores produzidos por células com a função de regular as respostas Imunológicas,

Inflamatórias e de cicatrização do hospedeiro à infecções, traumas ou tumores. A maioria delas é secretada durante a resposta imunológica ou Inflamatória. Quando são produzidas pelos linfócitos são denominadas linfocinas (interleucinas). Geralmente não estão presentes no soro e, ainda, as células produtoras de citocinas necessitam ser previamente estimuladas. As citocinas exercem atividade moduladora da resposta imunológica regulando o crescimento, mobilidade e diferenciação de leucócitos e outras células (Oppenheim et alii, 1991).

Na hanseníase Silva e Foss (1989) observaram, em culturas de macrófagos do sangue periférico, que doentes tuberculóides mantem acentuada estimulação macrofágica, com a conseqüente elevada produção de TNF, quando comparados com virchowianos e indivíduos não afetados sugerindo que macrófagos de virchowianos são menos reativos que os dos pacientes tuberculóides.

Entretanto, Sarno et alii (1991), estudando a produção de citocinas em doentes virchowianos com reação hansênica tipo eritema nodoso, observaram que 50% dos pacientes com eritema nodoso apresentaram níveis elevados de TNF e 11,1, concluindo que estas citocinas podem participar das alterações imunológicas presentes na reação tipo eritema nodoso.

Tem sido descrito que α TNF é uma citocina de peso molecular 17.400, constituída de 157 aminoácidos, produzida especialmente por macrófagos (Oppenheim, 1991). Tem numerosas atividades biológicas destacando-se entre elas a indução de febre (Dinarello, 1990), da resposta hepática, geralmente acompanhada de leucocitose, e com a produção de proteínas da fase aguda, como proteína-C-reativa (Gauldie et alii, 1989), a

diferenciação e/ou ativação das células T, linfócitos B e macrófagos (Van Snick, 1990) e estimula a produção das citocinas IL1, IL6 e do próprio aTNF (Beutler & Cerami, 1988; Dinarello, 1990; Heinrich et alii, 1990).

Deste modo pode-se supor que durante a reação hansênica, especialmente em virchowianos com eritema nodoso e com aumento da concentração de TNF, haja indução da produção de interleucinas (IL1, IL6 e TNF), e estas estimulariam o hepatócito a produzir as proteínas da fase aguda, como a proteína-C-reativa, elevada nos estados reacionais. Entretanto, na ausência de reação hansênica, os macrófagos de virchowianos apresentam deficiência de produção de TNF (Silva e Foss, 1989) e os níveis de PCR aproximam-se da faixa de normalidade (Languillon, 1986).

Logo, a reação de eritema nodoso caracteriza um estado transitório de alterações imunológicas, no qual o doente virchowiano adquire potencialidade de resposta celular com a produção de citocinas, mas a participação destas na resposta imunocelular permanece não esclarecida.

Sabe-se que TNF atua na diferenciação e ativação de linfócitos T (Van Snick, 1990) e que proteína-C-reativa modifica o comportamento de linfócitos (Gotschlich, 1989) e que ambos TNF e PCR apresentam concentrações elevadas durante a reação, porém pouco se conhece sobre a ação destas proteínas na resposta proliferativa de linfócitos T.

Sendo a resposta linfoproliferativa um dos principais mecanismos de defesa do hospedeiro ao M.leprae, julgamos interessante estudar a participação do TNF e da PCR na blastogênese de linfócitos de doentes de hanseníase.

Assim, definiu-se como objetivo fundamental deste estudo a

investigação do efeito da proteína-C-reativa sobre a resposta linfoproliferativa de doentes de hanseníase, para se verificar a atividade imunomoduladora desta proteína sobre a blastogênese de linfócitos de doentes. Determinou-se também, a concentração de TNF e proteína-C-reativa no soro dos Indivíduos estudados, correlacionando seus níveis séricos, para observar se na hanseníase as variações da concentração de PCR se associam com alterações dos níveis de TNF.

Conhecendo que doentes com hanseníase virchowiana apresentam diferença na resposta proliferativa das subpopulações de linfócitos T, com predomínio dos supressores e citotóxicos (CD8⁺) em relação n linfócitos auxiliares (CD4⁺), enquanto pacientes com hanseníase tuberculóides apresentam atividade maior de linfócitos CD4⁺ que CD8⁺, semelhante aos Indivíduos normais (Modlin & Rea, 1987), desenvolveu-se o estudo com doentes virchowianos (com e sem reação hansênica), tuberculóides (tórpidos sem reação e reacionais) e indivíduos normais.

Para observar a proliferação das sub-populações de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺, utilizou-se os mitógenos fitohemaglutinina e concanavalina - A, pois é conhecido que a atividade mitogênica da última está relacionada a subpopulações de células Tsupressoras (Shou et alii, 1976 e Skane & Greene, 1977), enquanto a fitohemaglutinina é considerada boa ind u tora de proliferação celular "in vitro", especialmente das subpopulações com fenotipos CD4⁺ (Rottveel et alii, 1988; Bloemena et alii, 1989).

Deste modo o estudo de linfoproliferação "in vitro" foi desenvolvido em doentes de hanseníase (virchowiana e tuberculóide) com e sem reação hansênica e em indivíduos normais, sob estímulo de fitohemaglutinina,

concanavalina-A e proteína-C-reativa. A inclusão de doentes com reação hansênica foi programada com o objetivo de observar a relação entre as alterações imunológicas, presentes na reação inflamatória aguda, e a resposta linfoproliferativa.

DOENTE E CONTROLES
MÉTODOS

DOENTES E CONTROLES

Foram selecionados 72 indivíduos da região de Ribeirão Preto-SP, sendo 53 doentes de hanseníase e 19 indivíduos aparentemente normais, divididos em três grupos, como se observa na Figura 1.

Grupo I: Doentes virchowianos - constituído de 30 pacientes.

Grupo II: Doentes tuberculóides - constituído de 23 pacientes.

Grupo III: Controles - constituído de 19 indivíduos normais.

O diagnóstico dos casos de hanseníase foi baseado nos exames clínico, histológico, bacterioscópico (material de lesão da pele e muco nasal). Os doentes foram classificados segundo critérios adotados no VI Congresso Internacional de Leprologia, Madri, 1953, em virchowianos (V) e tuberculóides (T).

Os controles foram examinados com a finalidade de verificar se não apresentavam lesões sugestivas de hanseníase e submetidos à reação de Mitsuda com o mesmo antígeno utilizado em doentes.

Grupo I: Doentes Virchowianos

Foram estudados 30 doentes de hanseníase virchowiana atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, com idade variando entre 21 a 60 anos (média 46,0 anos).

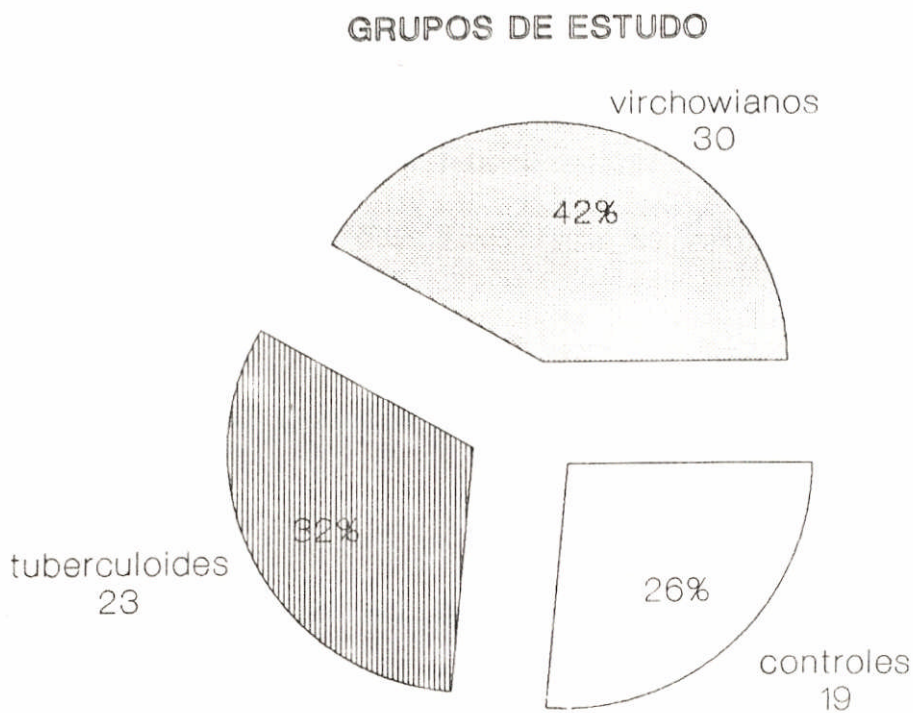


FIGURA 1 - APRESENTAÇÃO DOS DOENTES E CONTROLES E FREQUÊNCIA DE INDIVÍDUOS EM CADA GRUPO ESTUDADO.

Na Tabela I observa-se que a maioria dos doentes (86%) estava sendo tratada com Dapsona (DDS), na dose de 100 mg/dia, por tempo variado; houve predominância de pacientes do sexo masculino (19 doentes - 63%). Foram positivos (1+ a 3+) os resultados dos exames baciloscópicos de lóbulo de orelha em 13 doentes (43%). Nos restantes foram negativos, tratando-se de doentes submetidos à terapêutica durante vários anos, até 1015 ou 20 anos. Nota-se também, que todos doentes tiveram reação de Mitsuda negativa e que doze (12) deles apresentavam reação dos tipos eritema nodoso em dez (10) doentes e eritema polimorfo em apenas dois doentes.

Deve ser destacado que apesar de 12 doentes apresentarem reação hansênica, por ocasião da coleta de sangue, nenhum deles estava sendo tratado com droga imunossupressora, como se nota na Tabela I.

Grupo II: Doentes Tuberculóides

Foi constituído de 23 doentes de hanseníase tuberculóide atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, com idade variando entre 18 a 60 anos (média 42,5 anos) (Tabela II).

Observa-se que foi semelhante a distribuição de sexo no grupo II (12 masculinos e 11 femininos) e, que todos doentes foram lepromino-reativos com respostas variando entre 1+ (12), 2+ (9) e 3+ (2). Foram sempre negativos os resultados da baciloscopia de material de lesões cutâneas; apenas dois

pacientes (nas 18 e 19) a baciloscopia de lóbulo de orelha foi positiva (1+). Nota-se, ainda, que por ocasião da coleta de sangue, oito (8) doentes apresentavam reação caracterizada por eritema e infiltração de lesões, neurite geralmente discreta e edema de extremidades, especialmente de pés e mãos; nenhum deles estava sendo tratado com drogas imunossupressoras.

Considerando a presença de doentes tuberculóides em reação, o Grupo II foi subdividido em: tuberculóides tórpidos (15 doentes) e tuberculóide em reação (8 doentes).

TABELA I - DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS DOENTES VIRCHOWIANOS.

No. ORDEM	IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE (ANOS)	CLASSIFICAÇÃO		REAÇÃO HANSÊNICA	REAÇÃO LEPROMÁTICA	BACILOSCÓPIA		TRATAMENTO			
				CLÍNICA	HISTOLÓGICA			L0	MV	DRUGA	DOSEmg/d	DURAÇÃO	REGULARIDADE
1	ADK	M	48	V	V	-	NEGATIVA	2+	-	DDS	100	6A	R
2	DCS	M	56	V	V	-	NEGATIVA	-	-	DDS	100	6A	R
3	MASS	F	27	V	V	-	NEGATIVA	1+	-	DDS	100	2A	R
4	MSCS	M	24	V	V	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	5A	R
5	AM	M	59	V	V	-	NEGATIVA	1+	-	DDS	100	1A	R
6	AHL	M	52	V	V	-	NEGATIVA	2+	-	DDS	100	17M	R
7	MUS	M	54	V	V	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	15M	R
8	VB	M	57	V	V	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	10A	R
9	JEL	F	43	V	V	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	1A	R
10	RRF	M	56	V	V	-	NEGATIVA	2+	-	-	-	-	-
11	AM	M	50	V	V	-	NEGATIVA	1+	-	DDS	100	2A	R
12	TA	F	52	V	V	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	10A	R
13	SSH	M	43	V	V	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	2A	R
14	PLF	M	24	V	V	-	NEGATIVA	3+	1+	-	-	-	-
15	JLR	M	44	V	V	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	5A	R
16	LVR	F	56	V	V	-	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	12A	R
17	LCR	M	48	V	V	-	NEGATIVA	1+	1+	-	-	-	-
18	RRS	F	50	V	V	-	NEGATIVA	1+	-	DDS	100	10M	R
19	AS	M	55	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	1+	-	DDS	100	18M	R
20	CAS	M	21	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	2+	-	DDS	100	200	R
21	ART	F	31	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	1+	-	DDS	100	6M	R
22	PV	M	55	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	5A	P
23	CNO	F	31	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	15A	R
24	BSA	M	58	Vr	Vr	EP	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	6A	P
25	MP	F	58	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	8A	F
26	EASY	F	22	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	2+	-	DDS	100	1M	R
27	FCF	M	52	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	20A	R
28	JBB	M	38	Vr	Vr	EP	NEGATIVA	2+	-	-	-	-	-
29	ACC	M	60	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	5A	R
30	MDP	F	51	Vr	Vr	EN	NEGATIVA	NEGATIVAS	-	DDS	100	2A	R

V = Virchowiano Vr = Virchowiano Reacional EN = Eritema Nodoso EP = Eritema Polimorfo L0 = Lóbulo de Orelha MN = Muco Nasal
R = Regularidade A = Anos M = Meses D = Dias DDS = Dapsone - = Não Tratado

TABELA II - DADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS DOS DOENTES TUBERCULÓIDES.

No. ORDEN	IDENTIFICAÇÃO	SEXO	IDADE (ANOS)	CLASSIFICAÇÃO		REAÇÃO LEPROINICA	BACILOSCÓPIA		TRATAMENTO			
				CLÍNICA	HISTOLÓGICA		LESION CUTANEA	LO	DROGA	DOSE	DURACÃO	REGULARIDADE
1	JLT	M	31	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	10M	R
2	CAS	M	18	T	T	1+	NEGATIVAS		-	-	-	-
3	JMO	M	48	T	T	1+	NEGATIVAS		DDS	100	1A	R
4	ADBF	F	33	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	1M	R
5	MDSO	F	31	T	T	3+	NEGATIVAS		DDS	100	1A	R
6	ETS	M	52	T	T	1+	NEGATIVAS		DDS	100	8H	R
7	CLCS	F	47	T	T	1+	NEGATIVAS		DDS	100	15D	R
8	IR	F	31	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	4M	R
9	JAS	M	55	T	T	3+	NEGATIVAS		DDS	100	1M	R
10	AAS	M	52	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	4A	R
11	MJP	F	46	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	8H	R
12	BCO	F	58	T	T	2+	NEGATIVAS		-	-	-	-
13	CCL	F	52	T	T	1+	NEGATIVAS		DDS	100	2A	R
14	MGE	F	35	T	T	1+	NEGATIVAS		-	-	-	-
15	VHP	F	57	T	T	2+	NEGATIVAS		DDS	100	3M	R
16	VDS	M	59	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS		-	-	-	-
17	DA	M	60	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS		DDS	100	11M	R
18	AA	M	33	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS	1+	DDS	100	1M	R
19	APG	F	28	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS	1+	DDS	100	2M	R
20	JMS	M	30	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS		DDS	100	3M	R
21	MPPA	F	20	Tr	Tr	2+	NEGATIVAS		DDS	100	15D	R
22	AJS	M	58	Tr	Tr	1+	NEGATIVAS		DDS	100	1A	R
23	PCS	M	23	Tr	Tr	2+	NEGATIVAS		-	-	-	-

T = Hanseniase Tuberculóide
 DDS = Dapsona

Tr = Hanseniase Tuberculóide em Reação
 LO = Lóbulo de Orelha

R = Regularidade
 - = Não Tratado

Grupo In: Controles

Nos controles foram estudados 19 indivíduos aparentemente normais, com idade variando entre 20 a 50 anos (média 28,2 anos), de ambos os sexos (12 masculinos e 7 femininos), a maioria deles estudantes do curso de graduação em medicina (FMRP-USP); que foram subdivididos segundo a resposta à reação de Mitsuda em: lepromino-positivos (11 Indivíduos) e lepromino-negativos (8 indivíduos).

TABELA III - DADOS REFERENTES AO GRUPO CONTROLE.

No. ORDEM	SEXO	IDADE (ANOS)	REAÇÃO		CONTATO PRÉVIO		FÓCO
			LEPROMÍNICA		TIPO	DURAÇÃO	
1	M	26	1+		0	5A	II
2	M	22	1+		0	1A	H
3	M	24	2+		0	1A	H
4	M	23	1+		0	1A	H
5	M	25	2+		0	1A	H
6	F	21	2+		0	1A	H
7	M	22	1+		0	1A	H
8	F	36	3+		F	>10A	HV
9	M	50	2+		0	>10A	H
10	F	27	1+		0	2A	H
11	F	47	1+		0	>10A	H
12	F	20	NEGATIVA		F	3A	HV
13	M	27	NEGATIVA		0	5A	H
14	F	28	NEGATIVA		0	3A	H
15	F	40	NEGATIVA		F	>10A	HV
16	M	24	NEGATIVA		0	1A	H
17	M	23	NEGATIVA		0	1A	II
18	M	23	NEGATIVA		0	1A	II
19	M	28	NEGATIVA		0	1A	H

0 = Operacional
 F = Familiar
 HV = Virchowiano
 H = Hanseníase

MÉTODOS

1. Coleta de Dados

Dados clínicos e laboratoriais referentes aos doentes foram anotados em fichas especiais que incluíam, também, informações sobre o, tipo de tratamento, dose, duração e regularidade do mesmo (Anexo I). Considerou-se tratamento regular quando os doentes compareciam à maioria das consultas de seguimento (75%); porém, como a ingestão de droga se faz no domicílio, não se tem certeza da regularidade de tratamento.

Por ocasião da coleta de sangue todos os pacientes e controles foram examinados, fez-se a reação de Mtsuda e, nos doentes, a pesquisa de bacilos em esfregaços de material de lesão de pele e muco nasal.

2. Exame Bacterioscópico

Os esfregaços foram corados pela técnica de Ziehl Neelsen. O grau de positividade foi determinado de acordo com a recomendação da Segunda Conferência Panamericana de Lepra (1974):

- **Negativo:** nenhum bacilo encontrado em 100 campos;
- **Positivo 1+:** um ou menos que um bacilo em cada campo;
- **Positivo 2+:** bacilos encontrados em todos os campos;
- **Positivo 3+:** muitos bacilos encontrados em todos os campos.

3. Reação de Mitsuda

Reação de Mitsuda é a resposta observada 4 semanas após injeção intradérmica de 0,1 ml de uma suspensão estéril de bacilos de Hansen, mortos pelo calor, extraídos mecanicamente de hansenomas. O teste foi feito em todos doentes e nos controles por ocasião da coleta de sangue. A suspensão de bacilos foi preparada de acordo com a técnica de Mitsuda (1953), contendo 60×10^6 bacilos por ml. Fez-se a leitura 28-30 dias após, seguindo o critério recomendado no VII Congresso Internacional de Leprologia (Tóquio, 1958) com modificações propostas por Hanks et al. (1970):

- **Negativo** - : ausência de reação
- **Duvidoso** : infiltração com diâmetro inferior a 3mm

- **Positivo +** : pápula com diâmetro entre 3 e 5 mm
- **Positivo ++** : induração com diâmetro maior que 5 e menor ou igual a 10 mm.
- **Positivo +++**: induração com diâmetro superior a 10 mm ou ulcerada.

4. Extração de Proteína-C-Reativa (PCR) de Soro Humano

Todo processo de extração e purificação de PCR do soro humano foi desenvolvido sob orientação do Prof. E. Brandt de Oliveira, no Departamento de Bioquímica da FMRP-USP.

Amostras de soro PCR positivas foram coletadas e armazenadas a -20°C, completando um volume de 2.200 ml. Após descongelamento à temperatura ambiente fizeram-se:

. Duas precipitações com sulfato de amônio (nas concentrações de 333 g/l e 176 g/litro de soro), resultando um volume de 180 ml (sedimento da segunda precipitação).

. Diluiu-se o sedimento com água deionizada e acrescentou-se EDTA (etilenodiaminotetracetato dissódico) numa concentração final de 5 mM. Centrifugou-se a 1200 rpm durante 10 minutos.

. Aplicou-se o sobrenadante em coluna de SephadexG-25 (Pharmacia Fine Chemicals) equilibrada com salina (cloreto de sódio 0,9%), para filtrar o

sulfato de amônio. Coletou-se as frações em tubos numerados.

. Determinaram-se as frações que continham a proteína pelo teste com coomassie (0,25%), no qual estas amostras coram-se em azul com Intensidade proporcional à concentração protéica.

. As frações de sulfato de amônio foram determinadas pelo aspecto leitoso adquirido após adição de hidróxido de bário.

. Após filtração em Sephadex G-25 foram obtidos três tipos de frações:

- *Nº 1-14 volume inicial ("void volum")*

- *Nº 15-31 frações protéicas (coomassie +)*

- *Nº 27-50 frações sulfato de amônio (aspecto leitoso)*

- As frações de nº 16 a 26 foram agrupadas e em seguida foi acrescentado cloreto de cálcio (CaCl₂) 5 mM. Esta solução foi adicionada 6. coluna de Sepharose-4-bis-epoxi fosforil-etanolamina (resina de afinidade), equilibrada com tampão contendo 2,0 mM de TBS ("Tris buffer saline") e 5 mM de CaCl₂, pH = 7,5.

- Coletaram-se amostras coomassie positivas (proteína-C reativa), que foram as frações de rigs 6, 7 e 8, constituindo a solução de PCR. A concentração de PCR foi determinada em capilar com soro anti PCR humana.

. A solução de PCR foi cristalizada duas vezes com solução de sulfato de amônio saturada obtendo-se uma concentração de 8,2 mg de PCR/ml, a qual foi determinada pelo método de Biureto. Os cristais de PCR foram mantidos em estufa a 37°C.

5. Quantificação de Proteínas-C-Reativa de Doentes e Controles

Através do método nefelométrico determinou-se a concentração de proteína C-reativa (PCR) no soro dos grupos estudados, utilizando-se o aparelho ICS Analyser II (Immunochemistry Systems - Beckman).

O princípio do método baseia-se na comparação da leitura da amostra desconhecida, tratada previamente com anti-PCR humano, com a leitura do padrão de PCR~anti PCR de concentração conhecida.

Os resultados são apresentados em mgPCR/dl de soro.

6. Dosagem do Fator de Necrose Tumoral - α TNF no Soro de Doentes e Controles

Utilizou-se o "Kit" de análise imunorradiométrico para o fator de necrose tumoral - α TNF (Medgenix diagnostics - código 30-17520 PO Box 42

- Belgium).

O teste é ensaio imunoradiométrico baseado na reação imunológica, entre o α TNF existente no soro (antígeno) e o anti- α TNF (anticorpo) com o qual o tubo da análise é revestido.

Tubos plásticos revestidos com anti α TNF, ligado na parte inferior e interna do tubo, são utilizados para a dosagem da concentração de α TNF do soro. A reação imunológica é revelada pela adição de anti α TNF- I^{125} (anticorpo marcado com iodo radioativo- P^{125}), que é detectada pela medida de radioatividade em contador gama.

Procedimento:

Para cada ensaio faz-se uma curva padrão em amostras de α TNF de concentrações conhecidas (0, 15, 50, 150, 500, 1500 e 5000 pg/ml).

. Nos tubos revestidos e numerados, em duplicatas, são colocadas as amostras padrão e desconhecida (200 p/ cada). A determinação da contagem total é feita em tubo não revestido contendo apenas o anti α TNF- I^{125} .

. Adiciona-se a todos os tubos anti α TNF- I^{125} (50 μ l Agita-se delicadamente.

. Incuba-se na temperatura ambiente, no período de 16 a 20 horas.

. Aspira-se, cuidadosamente todo o líquido do tubo

- . *Lavam-se os tubos 2x com solução de Tween 20 na concentração de 20%.*
- . *Aspira-se, novamente, todo o líquido do tubo. Para maior reprodutibilidade o tubo deve estar sem uma gota de líquido.*
- . *Contam-se os tubos em contador gama durante 60 segundos cada.*
- . *Prepara-se a curva padrão colocando-se a relação entre leitura obtida do cintilador gama (cpm) das amostras ("bound" - padrão) e a contagem total (I125 livre).*

$$R = \frac{\text{cpm(padrão)}}{\text{cpm total}} \times 100$$

No gráfico projetou-se os valores de R na ordenada e as concentrações de α TNF na abcissa.

- . *Após, determina-se a concentração de α TNF no soro interpondo-se os valores do coeficiente R na curva padrão.*

Fez-se então, a curva padrão de α TNF (Figura 2).

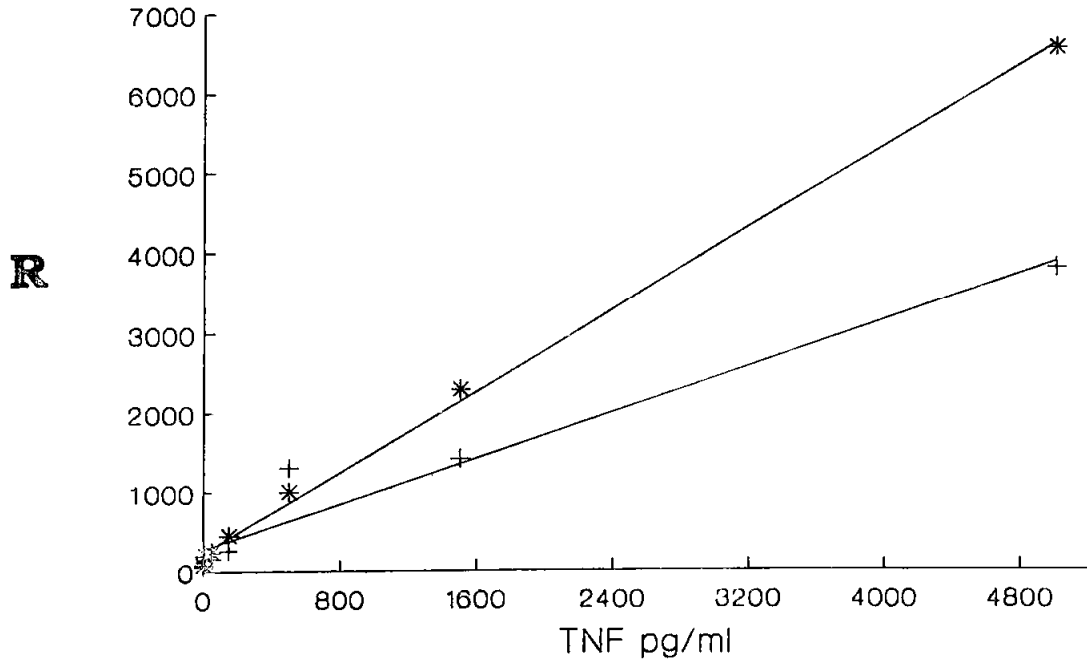


FIGURA 2 - CURVA PADRÃO - TNF IRMA.

7. Teste de Linfoproliferação "In Vitro" Pelos Mitógenos Fitohemaglutinina (PHA) e Concanavalina-A (CON-A)

7.1. Princípio do método

Basicamente o método consiste na manutenção de células

mononucleares, em sistema controlado de cultura "in vitro", no qual são mantidas as condições fisiológicas do ambiente físico-químico (temperatura, pH, pressão osmótica, tensão de oxigênio e de dióxido de carbono na interface gás-líquido), de necessidades nutritivas, substâncias reguladoras e condições de esterilidade, permitindo que haja interação celular, proliferação e preservação de funções celulares especializadas.

Linfócitos cultivados "in vitro" podem ser estimulados por mitógenos ou antígenos e a resposta resultante pode ser utilizada para quantificar a imunocompetência celular. Pela interação entre linfócitos sensibilizados e antígenos específicos são gerados mediadores solúveis (fatores: blastogênicos, quimiotáticos, de ativação celular, de inibição da migração celular, de reatividade cutânea e outros). A resposta imunocelular é refletida pela habilidade destes fatores em promover a transformação blástica "in vitro".

A quantificação da proliferação de linfócitos pode ser realizada através de métodos morfológicos ou, mais precisamente, através da análise da síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA). A incorporação de timidina exógena marcada de baixa atividade específica (³H-timidina), para prevenir o dano celular radioativo ao DNA de células em cultura durante período fixo, é medida por contador de cintilação. A quantidade de timidina utilizada deve ser suficiente para manter a incorporação através de todo período de "pulso". Este período é usualmente de 9 a 24 horas, para evitar os efeitos de síntese assincrônica de DNA linfocitário. A magnitude da resposta das células a um estímulo particular varia com as condições da cultura, densidade celular e concentração do agente ativador, assim como o momento e duração do pico

da resposta depende do estímulo utilizado e sua concentração (Ford & Hunt, 1973).

7.2. Teste de linfoproliferação "in vitro"

Foi desenvolvido em câmara de fluxo laminar, submetida previamente (durante 15 a 30 minutos) à irradiação com luz ultra-violeta (280 nm), para que fosse minimizada a possibilidade de multiplicação bacteriana nas superfícies da câmara.

O método foi executado em linfócitos do sangue periférico separados através do gradiente de separação Ficoll-Hypaque (metrizoato sódico).

Quando o sangue com anticoagulante é colocado sobre a mistura Ficoll-Hypaque e centrifugado, os elementos celulares dividem-se em duas frações principais: granulócitos e eritrócitos sedimentados no fundo do tubo, células mononucleares (85% linfócitos e 15% monócitos) e parte das plaquetas que permanecem na interface entre o gradiente e o soro, podendo ser então removidas (Boyum, 1968). Entretanto, se o sangue é previamente diluído o rendimento de células mononucleares aumenta (Ford & Hunt, 1973).

Após a separação, os linfócitos são submetidos a processo de lavagem para eliminação de resíduos do Ficoll-Hypaque, e ressuspensos em meio de cultura, ficando em condições de serem cultivados "In vitro".

7.2.1. Técnica

- . Colhe-se em condições de esterilidade, 7,0 ml de sangue venoso, utilizando tubo de coleta à vácuo heparinizado e siliconizado (Vacuntainer, B.D.).

- . Dilui-se o sangue total com igual volume de meio de cultura estéril (RPMI 1640) a 37°C e homogeneiza-se suavemente com pipeta de Pasteur.

- . Coloca-se o sangue diluído, lenta e cuidadosamente, sobre 7,0 ml de FicollHypaque. Centrifuga-se a 400 g (1400 rpm) durante 30 minutos, na temperatura ambiente.

- . Após centrifugação verifica-se a formação de camadas distintas: superior, contendo plasma e plaquetas; interface, contendo células mononucleares (90% linfócitos), média gradiente Ficoll-Hypaque e Inferior, contendo granulócitos e hemácias.

- . Com pipeta de Pasteur aspira-se, cuidadosamente, a camada de linfócitos transferindo-a para um tubo cônico estéril (esta fase é crítica, pois o volume de linfócitos é pequeno e pode ocorrer contaminação, não desejada, com as camadas superior ou média).

- . Ressuspendem-se as células com solução salina isotônica. Centrifuga-se a 200 g (1000 rpm) durante 10 minutos, despreza-se o sobrenadante, repetindo-se o processo por duas vezes.

. Ressuspendem-se as células com 1,0 ml de meio de cultura e procede-se a contagem desta suspensão utilizando diluidor automático (Celm, modelo DA 500) e contador automático (Celm, modelo CC 510).

. Avalia-se a viabilidade dos linfócitos com azul de Trypan a 2% (Trypan Blue 2%). O método baseia-se na capacidade de células vivas repelirem o corante (Fig. 3) (Ford & Hunt. 1973).

. Dilui-se a suspensão de células com meio de cultura enriquecido com soro AB humano (na concentração de 15%), inativado pelo calor, para obter concentração de $2,5 \times 10^6$ linfócitos/ml.

. Prepara-se a placa de cultura (marca - Corning), colocando-se em cada poço 0,1 ml de meio de cultura e os estimulantes, em concentração determinadas em experimentos tipo dose-resposta, que serão descritos posteriormente.

FIGURA 3- TESTE DE VIABILIDADE DOS LINFÓCITOS: LINFÓCITOS VIÁVEL, NÃO CORADO PELO "AZUL DE TRYPAN (- >). E CÉLULAS INVIÁVEIS CORADAS PELO REAGENTE (--->).

Adiciona-se a cada poço, Id preparado, 0,1 ml da suspensão de células ($2,5 \times 10^5$ linfócitos por poço), preparando-se culturas triplicatas de 0,2 ml cada segundo o protocolo:

- a) Controle: contendo $2,5 \times 10^5$ linfócitos

- b) PHA: contendo $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PHA

- c) PHA/PCR: contendo $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PHA + PCR

- d) ConA: contendo $2,5 \times 10^5$ linfócitos + ConA

- e) ConA/PCR: contendo $2,5 \times 10^5$ linfócitos + ConA + PCR

- f) PCR: contendo $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PCR

. As placas foram fechadas e incubadas a 37°C , em ambiente úmido e com CO_2 A. concentração aproximada de 5% durante 3 dias.

Esta condição particular foi conseguida, através de "incubadora" de acrílico confeccionada na oficina de precisão da FMRP, contendo vias de entrada e saída de mistura de ar e CO_2 e recipiente com água destilada para manutenção da umidade.

. Dezesesseis horas antes do término do período de incubação das células adiciona-se 0,5 microcuries de 3H-timidina.

- . Completado o tempo de cultura procede-se à coleta das células utilizando-se coletor automático "Automated Cell Harvester" (este aparelho aspira as células e lava os poços seqüencialmente com salina, TCA 5% e metanol absoluto, recolhendo os linfócitos em papel de filtro (Fiber-Glass).
- . Cada poço coletado tem uma área correspondente no papel de filtro ,que é então recortado e colocado em frasco para cintilação líquida ,no qual se adiciona líquido de cintilação e conta-se a radioatividade com auxílio de espectômetro de cintilação líquida Beckman LS150,durante 10 minutos por frasco .

7.2.2. Reagentes

. Meio de cultura

Utilizou-se RPMI com glutamina sem bicarbonato de sódio, liofilizado (Lote 10077 - Flow Laboratories USA), contendo soro humano AB inativado, na concentração de 15%, penicilina 150 UI/ml, estreptomicina 80 µg/ml, bicarbonato de sódio 2,0 g/litro e tampão biológico HEPES - 20 mM/I (INLAB - PM: 238,31 - lote 812940).

. Mistura Ficoll-Hypaque

Hypaque de sódio 50%..... 100 ml
 Ficoll solução a 9% 345 ml

Água deionizada 47,5 ml

- Hypaque - Wintrop Products (New York - USA)

- Ficoll - PM: 40 x 104 - Sigma Chemical Company - USA

A solução foi mantida à temperatura ambiente em frasco escuro, e esterilizada no momento em que foi utilizada.

Densidade final da mistura 1075 mg/ml.

- **Azul de Tripán**

Trypan Blue - Direct Blue 15 - Sigma Chemical Company. Lote: 015F00601.

- **3H - Timidina**

Thymidine methyl - 3H PM: 242,2 - Concentração: 0,036 mg/ml. Atividade específica: 6,7 Curies/mM - solução aquosa estéril. New England Nuclear - Radiochemical Specifications.

- **PPO 2,5 - Diphenyloxazole - PM anidro: 221,3.**

- **POPOP 2,2' p-phenylen bis (5-phenyloxazol) - PM: 364,41.**

- **Tolueno: Merk**

7.2.3. *Mitógenos*

- Fitohemaglutinina: (1%) PHA: Bacto (Difco Laboratories) Lote: 3110-56.
- Concanavalina A: ConA: Sigma Chemical Company. Lote: C-2010.

7.2.4. *Proteína C-Reativa (PCR)*

Os cristais de PCR em sulfato de amônio foram suspensos em meio de cultura estéril (sem soro humano) e aplicados em coluna de G-25 (0,9 cm de diâmetro por 5,0 cm de altura) e filtrados, para a obtenção de PCR pura, imediatamente antes do uso da solução nas culturas de linfócitos.

Durante a filtração colhem-se amostras de 0,3ml cada num total de 10 amostras. Determinam-se as amostras que contem PCR através do coomassie.

As amostras coomassie positivas são agrupadas e diluídas para serem usadas no teste de linfoproliferação(Fig. 4).

FIGURA 4 - FILTRAÇÃO EM GEL 0-28 E APRESENTAÇÃO DAS AMOSTRAS CONTENDO PROTEÍNA-C-REATIVA. CORADAS EM AZUL (NÚMEROS 6, 7 E 8).

7.2.5. Placas de culturas

Foram utilizadas placas de acrílico, estéreis com 96 poços cada, de fundo plano e com tampa (marca Corning, Lot. n° 25860 - New York - USA).

7.2.6. Esterilização dos reagentes

Todos os reagentes foram esterilizados pela passagem através de

filtros estéreis (GA-3 Metricell 0,2 m/, diâmetros 25 e 50mm), para utilização Imediata.

7.2.7. Antígeno de Mitsuda - Mitsudina

Suspensão contendo 60×10^6 bacilos/ml - frascos de 2,0 ml, mantidos a temperatura de 4°C. Lot.: 10/89. Microbase (fornecido pelo Hospital Lauro de Souza Lima-SP).

8. Experimento Dose-Resposta Para Determinação da Concentração de Proteína-C-Reativa (PCR) a Ser Utilizada nas Culturas

Estes experimentos foram realizados com o objetivo de determinar a concentração mínima de PCR que não fosse inibitória ou estimulante da biastogênese de linfócitos, ou seja, os resultados da linfoproliferação na presença de PCR deveriam ser semelhantes aos das culturas controles.

Assim, desenvolveu-se o teste em 35 indivíduos sendo: 13 doentes de hanseníase virchowiana, 13 doentes de hanseníase tuberculóide e 9 indivíduos controles normais, cujos resultados se encontram nas Tabelas IV, V. VI e Figura 5.

Após a separação dos linfócitos, seguindo a técnica anteriormente descrita (7.2.1) foram preparadas culturas triplicatas (0,2 ml cada) seguindo

o protocolo:

- Culturas controles: $2,5 \times 10^5$ linfócitos
- Culturas PCR₁: $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PCR 5,0 µg/ml
- Culturas PCR₂: $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PCR 10,0 µg/ml
- Culturas PCR₃: $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PCR 20,0 µg/ml

Utilizou-se a PCR preparada segundo Item 7.2.4.

A quantificação da resposta celular foi feita utilizando-se o quociente médio entre a contagem da emissão de radiação por minuto (cpm - medido em contador de cintilação) na presença e na ausência de PCR, o que representa a proporção de incorporação de timidina ou proliferação celular, definindo o índice de estimulação (IE).

$$I E = \frac{\text{cpm na presença de PCR}}{\text{cpm na ausência de PCR}}$$

Os resultados em cpm e os respectivos índices de estimulação encontram-se nas Tabelas IV, V e VI e Figura 5.

A análise dos resultados mostra que as concentrações de PCR utilizadas não foram inibitórias nem estimulantes do teste de proliferação de linfócitos, em doentes virchowianos, tuberculóides e controle normais. A análise de variância de Friedman aplicada aos dados demonstrou não haver

diferenças significantes entre as três concentrações de PCRna linfoproliferação de virchowianos ($\chi^2 r = 0,50$, $p > 0,70$ n.s./ $\chi^2 r$; $0,05 = 5,99$), tuberculóides ($\chi^2 r = 3,85$, $p > 0,10$ n.s.) e controles ($\chi^2 r = 5,17$, $p > 0,05$ n.s.).

Diante destes achados optou-se pela concentração de 5,0 μg de PCR, por ser a menor dose.

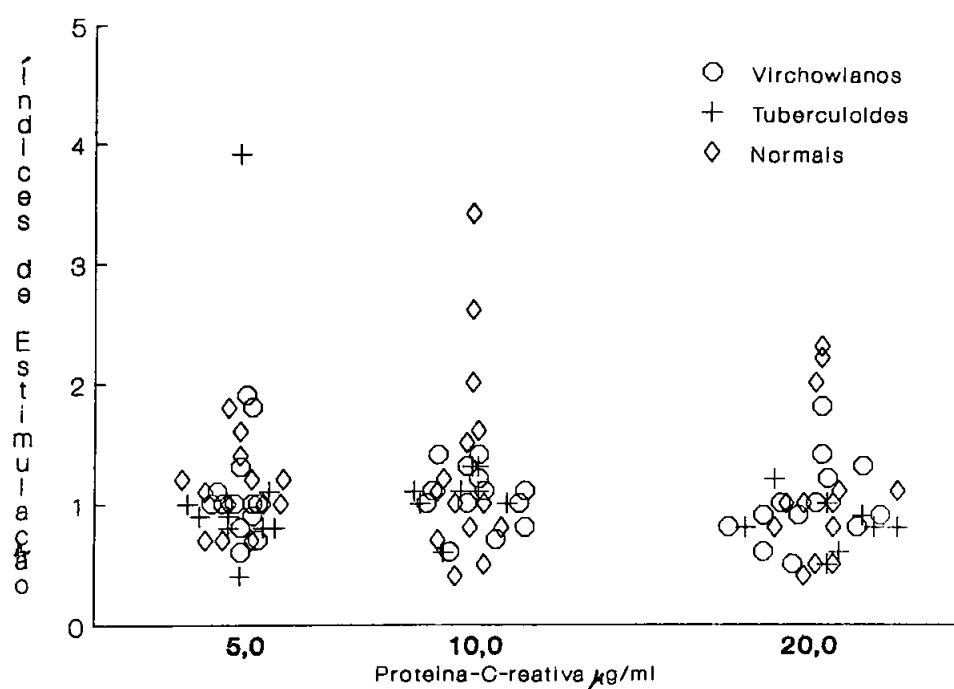


FIGURA 5 - RESULTADOS DA LINFOPROLIFERAÇÃO ESTIMULADA PELA PROTEÍNA-C-REATIVA, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES, EM DOENTES DE HANSENÍASE E INDIVÍDUOS NORMAIS.

TABELA IV - CONTAGENS POR MINUTO(CPM) E ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DA LINFOPROLIFERAÇÃO DE DOENTES DE HANSENÍASE VIRCHOWIANA, EA DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR).

No.	PCR 5,0 µg/ml		PCR 10,0 µg/ml		PCR 20,0 µg/ml	
	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE
1	2094	1,6	3339	2,6	3049	2,3
2	1858	1,2	2322	1,5	3094	2,0
3	4927	1,8	5443	2,0	6020	2,2
4	1257	1,4	1078	1,2	988	1,1
5	1210	1,0	1196	1,0	1227	1,1
6	1720	0,7	1573	0,5	1316	0,5
7	234	1,2	161	0,8	159	0,8
8	1536	0,7	1616	0,7	1074	0,5
9	1850	0,7	847	0,4	890	0,4
10	229	1,0	184	0,8	196	0,8
11	140	1,0	249	1,6	156	1,0
12	196	1,1	205	1,1	196	1,0
13	212	1,2	199	1,0	199	1,0

TABELA V - CONTAGENS POR MINUTO (CPM) E ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO(IE)DA LINFOPROLIFERAÇÃO DE DOENTES DE HANSENÍASE TUBERCULÓIDE, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR)

No.	PCR 5,0 µg/ml		PCR 10,0 µg/ml		PCR 20,0 µg/ml	
ORDEM	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE
1	3832	1,9	1974	1,0	1941	1,0
2	2275	1,0	2716	1,2	4074	1,8
3	1752	1,1	2018	1,3	1497	0,9
4	1246	0,6	1144	0,6	935	0,5
5	159	1,0	172	1,0	141	0,8
6	282	1,8	162	1,0	144	0,9
7	170	0,9	221	1,1	242	1,2
8	137	1,0	154	1,0	132	0,9
9	179	1,0	149	0,8	146	0,8
10	242	0,8	226	0,7	205	0,6
11	166	0,7	275	1,1	265	1,0
12	207	1,0	292	1,4	266	1,3
13	300	1,3	312	1,4	315	1,4

TABELA VI - CONTAGENS POR MINUTO(CPM) E INDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DA LINFOPROLIFERAÇÃO DE INDIVÍDUOS NORMAIS, EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR)

No.	PCR 5,0 µg/ml		PCR 10,0 µg/ml		PCR 20,0 µg/ml	
	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE
1	4086	3,9	3490	3,4	2505	2,4
2	2190	0,9	3155	1,3	2150	0,9
3	3598	1,1	4123	1,3	2636	0,8
4	2705	0,8	3476	1,0	2024	0,6
5	985	0,4	1617	0,6	2069	0,8
6	1712	1,0	1935	1,1	1984	1,2
7	1508	0,8	2244	1,1	1046	0,5
8	140	0,8	189	1,1	136	0,8
9	239	0,9	276	1,0	276	1,0

9. Experimento Dose-Resposta para Determinação da Concentração de Fitohemaglutinina (PHA) e ConcanavalinaA a Ser Utilizada nas Culturas

Foi realizado o experimento com doses variadas dos mitógenos fitohemaglutinina e concanavalina-A com o objetivo de verificar a dose ideal estimulatória da biastogênese. Colheu-se o sangue de dois indivíduos normais, como descrito anteriormente.

Após a separação dos linfócitos, seguindo toda metodologia descrita no item 7.2.1., foram preparadas culturas triplicatas (0,2 ml cada) seguindo o protocolo:

A - Culturas Controles: $2,5 \times 10^5$ linfócitos

B - Culturas PHA₁: $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PHA 2,0 $\mu\text{g/ml}$

C - Culturas PHA₂: $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PHA 5,0 $\mu\text{g/ml}$

D - Culturas PHA₃: $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PHA 10,0 $\mu\text{g/ml}$

E - Culturas PHA₄: $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PHA 20,0 $\mu\text{g/ml}$

F - Culturas PHA₅: $2,5 \times 10^5$ linfócitos + PI IA 100,0 $\mu\text{g/ml}$

G - Culturas ConA₁ 2,5x10⁵ linfócitos + ConA 1,0 µg/ml

H - Culturas ConA₂ 2,5x10⁵ linfócitos + ConA 2,0 µg/ml

I - Culturas ConA₃ 2,5x10⁵ linfócitos + ConA 5,0 µg/ml

J - Culturas ConA₄ 2,5x10⁵ linfócitos + ConA 10,0 µg/ml

L - Culturas ConA₅ 2,5x10⁵ linfócitos + ConA 25,0 µg/ml

O experimento foi desenvolvido em placas para cultura de células (Corning) que foram fechadas e incubadas a 37°C, em ambiente úmido e com CO₂ à concentração aproximada de 5%, durante 3 dias.

Dezesseis horas antes do término do período de incubação das células adicionou-se 3H timidina.

Os resultados foram avaliados pela contagem de radioatividade em espectômetro de cintilação líquida.

Os resultados em cpm e os respectivos índices de estimulação encontram-se na Tabela VII.

TABELA VII - RESULTADOS EM CPM E RESPECTIVOS ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DA LINFOPROLIFERAÇÃO DE INDIVÍDUOS NORMAIS, ESTIMULADA PELOS MITÓGENOS FITOHEMAGLUTININA E CONCANAVALINA-A.

Culturas	DOADOR *1		DOADOR 2	
	cpm	IE	cpm	IE
Controle	190,5		235,6	
PHA 2,0 µg/ml	2247,8	11,8	978,8	4,2
PHA 5,0 µg/ml	3366,3	17,7	1785,6	7,6
PHA 10,0 µg/ml	4598,1	24,1	1472,2	6,2
PHA 20,0 µg/ml	5218,3	27,4	1733,5	7,4*
PHA 100,0 µg/ml	2831,8	14,9	1067,1	4,5
ConA 1,0 µg/ml	486,4	2,6	328,5	1,4
ConA 2,0 µg/ml	1173,7	6,2	463,3	2,0
ConA 5,0 µg/ml	2060,8	10,8	780,4	3,3
ConA 10,0 µg/ml	3566,5	18,7	1420,0	6,0*
ConA 25,0 µg/ml	3565,1	16,7	960,3	4,1

Observando os resultados nota-se que nas condições do experimento os mitógenos PHA e ConA apresentam maior atividade linfoproliferativa nas

concentrações de 20,0 µg/ml e 10,0 µg/ml, respectivamente.

Deste modo, utilizaram-se as concentrações de PHA-20 µg/ml e ConA 10,0 µg/ml, no desenvolvimento do projeto.

10. Análise Estatística

Para analisar os resultados do experimento dose-resposta utilizou-se o Teste de Friedman.

Os resultados da biastogênese de linfócitos, dos três grupos estudados, sob os mitógenos PHA e ConA, na presença ou ausência de PCR, foram avaliados pelo método de Wilcoxon.

Na avaliação dos níveis de PCR no soro e da resposta biastogênica de doentes com reação e sem reação hansênica utilizou-se o método de Mann Whitney.

Estudou-se a correlação entre resultados da linfoproliferação e concentrações de PCR, e das concentrações séricas de TNF e PCR, pelo do coeficiente de correlação(r) de Spearman.

RESULTADOS

Como foram utilizadas diferentes metodologias para o desenvolvimento do projeto os resultados serão apresentados, parceladamente, seguindo a ordem de descrição dos métodos.

1. Determinação da Concentração de Proteína-C-Reativa (PCR) no Soro dos Grupos Estudados

Na Tabela VIII observa-se que foi diferente a distribuição dos níveis de PCR, representados pela média (X) e Erro Padrão da Média (EPM), em mg/dl, nos três grupos. Nos virchowianos (grupo I) foram encontradas as maiores concentrações de PCR sérico, sendo a média de 1,84 mg/dl \pm 0,39, enquanto nos tuberculóides esta concentração é menor (X \circ 0,86 mg/dl \pm 0,11) e se aproxima dos níveis dos grupo controle (X - 0,68 mg/dl \pm 0,03).

TABELA VIII - CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNA-C-REATIVA - PCR (mg/dl) NO SORO DOS GRUPOS ESTUDADOS.

No.	GRUPO I (V)	GRUPO II (I)ml	GRUPO III (controle)
ORDEM	mg/dl	mg/dl	mg/dl
1	3,00*	0,70	0,60
2	0,60	0,65	0,50
3	8,00*	1,00*	0,65
4	9,40*	0,60	1,15
5	0,60	0,65*	0,82
6	0,65	0,80	0,63
7	0,60	0,60	0,65
8	0,80	0,60*	0,55
9	0,60	0,65	0,62
10	0,60	0,80	0,60
11	0,70	0,80*	0,91
12	0,60	0,80	0,70
13	0,80	3,00	0,75
14	4,00*	0,65	0,60
15	3,00*	0,80*	0,65
16	1,70*	0,95*	0,60
17	1,80*	0,60	0,75
18	1,80*	0,80	0,60
19	0,80	0,80*	0,65
20	0,70	1,41	X:0,68±0,03
21	2,42*	0,63	
22	0,60	0,70	
23	0,95	0,70*	
24	3,96*		
		X:0,86±0,11	
25	0,80		
26	1,20*		
27	2,12*		
28	0,65		
29	0,63		
30	0,70		
	X:1,84±0,39		

* REAÇÃO HANSÊNICA

Se no grupo I os resultados são analisados considerando a presença da reação hansênica, nota-se que virchowianos em reação apresentaram níveis de PCR sérico elevados ($X = 3,48 \text{ mg/dl} \pm 0,76$) comparados aos dos não reacionais, cujas concentrações foram semelhantes as do grupo controle ($X = 0,69 \text{ mg/dl} \pm 0,02$). A diferença entre estes valores é altamente significativa ($p < 0,00003$), o que sugere que a reação hansênica induz ao aumento da produção e liberação de PCR nos doentes virchowianos, (Tabela XI e Figura 6). Apesar do interesse de investigar se há associação entre níveis séricos de PCR e tipo de reação hansênica, este estudo foi prejudicado porque a maioria dos virchowianos

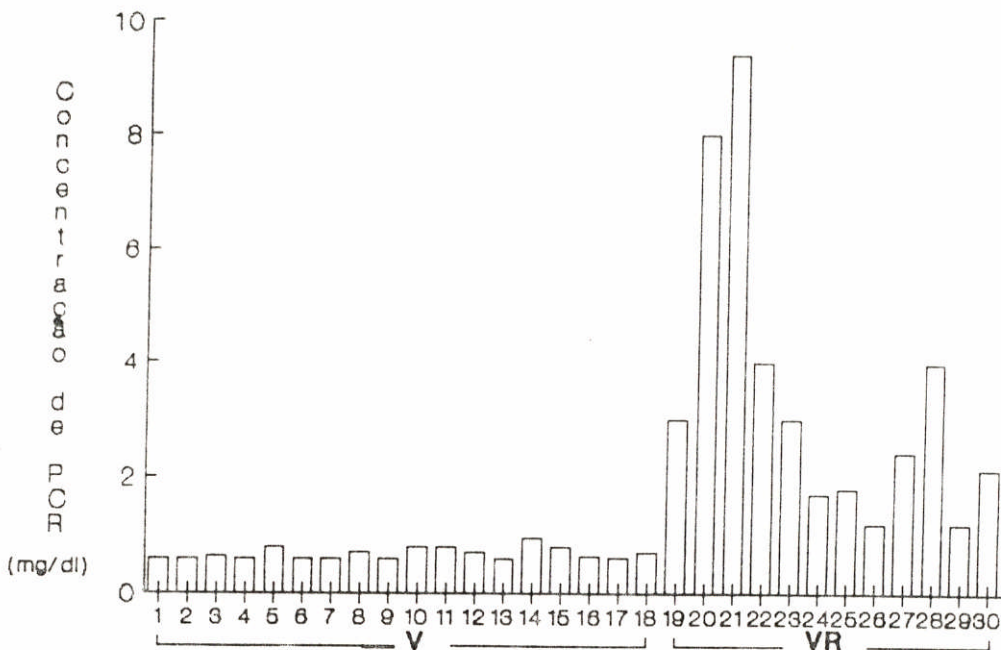


FIGURA 6 - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR) EM mg/dl NO SORO DE DOENTES VIRCHOWIANO.
V=hanseníase e virchowiana
VR virchowianos reacionais

No grupo II entretanto, foi observado que as concentrações de proteína-c-reativa no soro de tuberculóides em reação tendem a ser menores ($X = 0,78 \text{ mg/dl} \pm 0,05$) do que tórpidos ($X = 0,89 \text{ mg/dl} \pm 0,16$), porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Estes resultados favorecem a hipótese de que a reação em doentes tuberculóides não interferiria com a produção de PCR, sendo semelhantes os níveis desta proteína na presença ou não de reação (Figura 7).

As concentrações de PCR oscilaram em torno da média na maioria dos controles ($n = 19$) em apenas três deles (n.ºs. 4, 5 e 11) os valores afastaram-se do valor médio, (Tabela VIII e Figura 8).

Para verificar a influência da reação hansênica na concentração sérica de proteína-C-reativa foi feito estudo estatístico (Mann Whitney) para comparar os valores das formas reacionais e não reacionais com os do grupo controle.

Notou-se que virchowianos reacionais (Mediana $M=2,71 \text{ mg/dl}$) apresentam probabilidade elevada ($p < 0,0001$) de concentrações séricas de PCR maiores que as do grupo controle ($M=0,65 \text{ mg/dl}$), enquanto estas concentrações tendem a ser semelhantes às do grupo III em virchowianos sem reação ($M=0,65 \text{ mg/ml}$).

As concentrações de PCR no soro de tuberculóides em reação ($M=0,75 \text{ mg/dl}$) tendem a ser semelhantes às dos grupo controle ($M=0,65 \text{ mg/}$

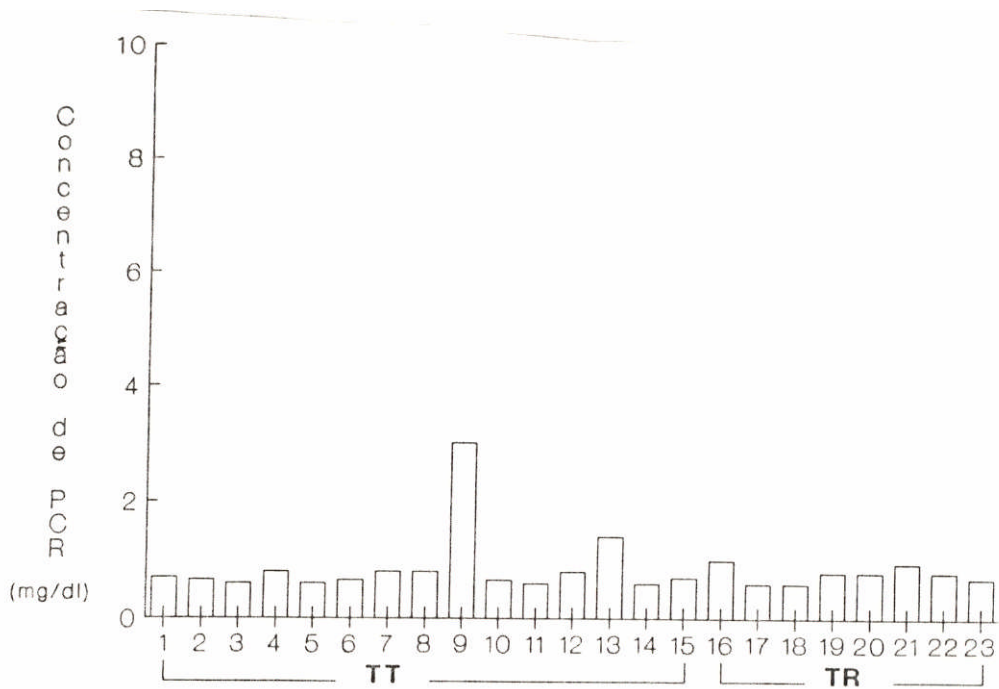


FIGURA - CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR) EM mg/dl NO SORO DE DOENTES TUBERCULÓIDES.
TT = tuberculose tórpida
TR= tuberculose em reação

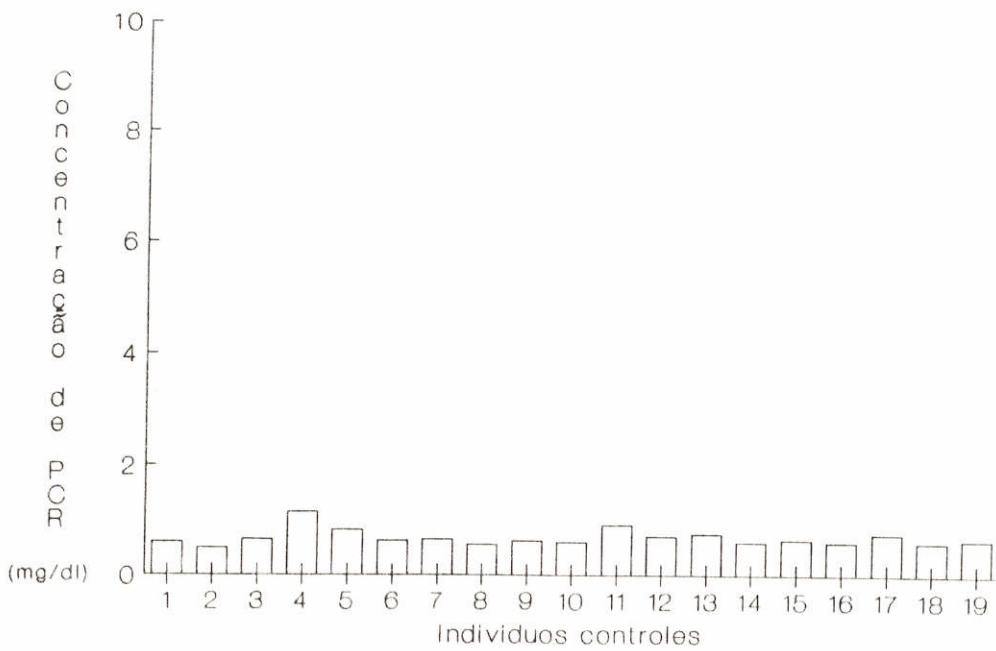


FIGURA 8- CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR) EM mg/dl NO SORO DO GRUPO CONTROLE.

dl), assim como as de tuberculóide não reacional (M=0,70mg/dl); portanto na hanseníase tuberculóide os níveis de PCR são semelhantes aos do grupo controle, independente da presença ou não de reação hansênica.

2. Concentração Serial do "Fator de Necrose Tumoral" (Tumor Necrosis Factor) - α TNF nos Grupos Estudados

As concentrações de α TNF, em picogramas por mililitro-pg/ml, no soro de doentes e controles encontram-se na Tabela IX. Nota-se que são maiores as concentrações séricas no grupo I (M=9,4 pg/ml) em relação ao grupo III (M=6,9 pg/ml). Comparando-se estas medianas, pelo método de Mann Whitney, havia 95% de probabilidade de maiores níveis de α TNF nos virchowianos do que nos controles (significaste ao nível de $p < 0,0001$).

Considerando os resultados de doentes com e sem reação hansênica verifica-se, na Tabela XI e Figura 9, que os 12 virchowianos com reação apresentaram concentrações elevadas de α TNF - M=112,9pg/ml, que diminuem acentuadamente nos pacientes sem reação (M=8,2pg/ml). Pela análise estatística observa-se que as concentrações séricas de α TNF são maiores em virchowianos com ou sem reação quando comparadas aos valores do grupo controle, sendo as diferenças significantes ao nível de $p < 0,00001$ e $p < 0,0003$, respectivamente.

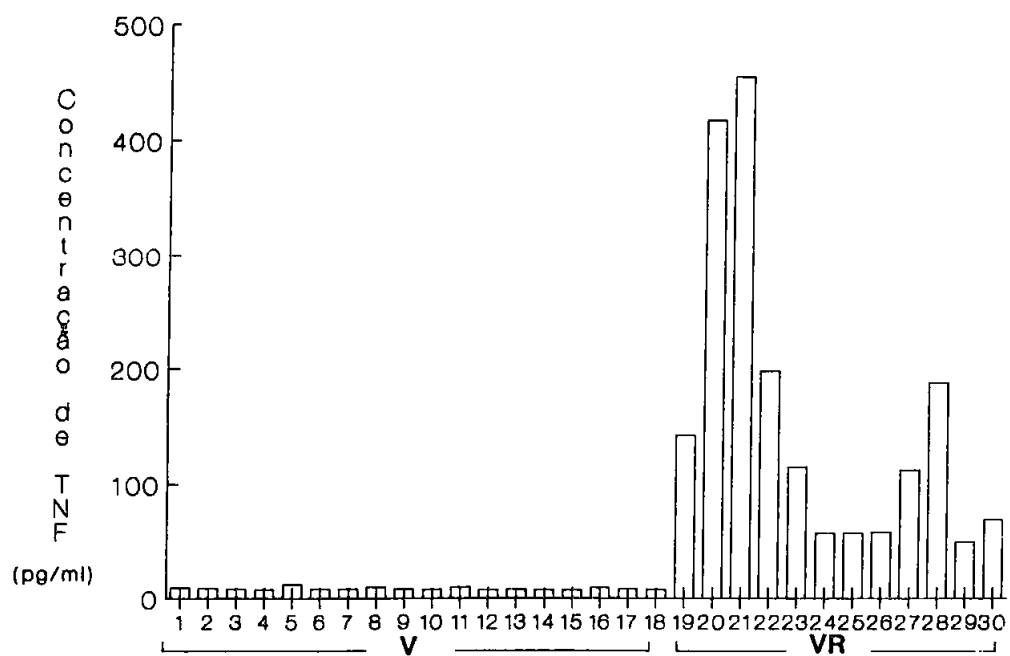


FIGURA 9 - CONCENTRAÇÕES DE FATOR DE NECROSE TUMORAL-TNF (pg/ml) NO SORO DE VIRCHOWIANOS.

V = virchowianos

VR = virchowianos reacionais

TABELA IX - DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE aTNF (pg/ml) NO SORO DOS GRUPOS ESTUDADOS.

No. ORDEM	cpm	GRUPO I (V)		GRUPO II (T)ml			GRUPO III (controle)		
		B/Tx100	pg/ml	cpm	B/Tx100	pg/ml	cpm	B/Tx100	pg/ml
1	1250	4,45	142,0*	470	0,99	12,2	268	1,02	6,9
2	356	1,36	9,2	517	1,10	13,5	220	0,84	5,7
3	2494	8,88	417,3*	657	2,51	49,0*	249	0,53	6,5
4	2718	9,68	454,9*	434	0,92	11,3	326	1,25	8,4
5	340	1,30	8,8	511	1,95	13,2	225	0,47	5,8
6	308	0,65	8,0	-	-	-	266	1,02	6,9
7	288	0,61	7,5	469	0,99	12,3	276	1,05	7,1
8	475	1,81	12,2	367	1,40	9,5*	266	1,02	6,9
9	316	0,67	8,2	555	2,12	14,3	121	1,23	8,3
10	321	0,68	8,4	707	2,51	48,9	285	1,09	7,4
11	356	0,79	9,7	398	1,52	10,3*	307	1,17	7,9
12	315	0,67	8,2	481	1,84	12,4	254	0,54	6,6
13	295	0,62	7,6	766	2,73	52,0	221	0,47	5,8
14	1305	4,99	197,5*	542	2,07	14,0	255	0,54	6,6
15	1004	3,58	114,3*	554	2,10	14,2*	271	0,57	7,0
16	839	2,99	57,0*	718	2,56	49,2*			M=6,9
17	775	2,76	57,2*	342	1,31	8,9			
18	858	3,05	58,2*	374	1,43	9,7			
19	387	0,82	10,1	586	2,24	15,1*			
20	264	1,01	7,1	388	1,48	10,0			
21	981	3,49	111,4*	330	1,26	8,5			
22	294	0,62	7,6	325	1,24	8,4			
23	276	0,58	7,1	343	0,72	8,9			
24	1234	4,72	186,8*						
						M=12,4			
25	274	1,05	7,1						
26	720	2,58	49,0*						
27	1010	2,89	68,6*						
28	361	1,38	9,3						
29	322	1,23	8,3						
30	287	1,10	7,4						
			M=9,4						

M = MEDIANA

CPM = CONTAGENS POR MINUTO

B = BOUND

T = TOTAL DE CPM EMITIDO PELO ANTI aTNF-I¹²⁵

PG/ML = PICOGRAMA/MILILITRO

* = REAÇÃO HANSÊNICA

Na Tabela IX nota-se ainda, que os valores máximos de aTNF sérico foram encontrados nos doentes nos. 3 e 4 do grupo I, que estavam com reação tipo eritema nodoso quando foi realizado este exame.

Os resultados da medida de aTNF sérico oscilaram, em torno do valor médio ($M=12,4\text{pg/ml}$) na maioria dos doentes de hanseníase tuberculóide, apenas quatro deles apresentaram níveis variando entre 48,0 a 52,0 pg/ml (pacientes nas. 7, 9, 16 e 21) dos quais dois (nas. 7 e 21) apresentavam surto de reação, como mostra a Tabela II.

Analisando separadamente os resultados de aTNF sérico em tuberculóides com e sem reação as medianas são semelhantes, $M=13,7$ e $12,3\text{pg/ml}$ respectivamente (Tabela XIV), mas em relação ao grupo controle observou-se 95% de probabilidade de maiores concentrações de aTNF em doentes tuberculóides com ou sem reação ($p < 0,00001$), sugerindo que os níveis de aTNF podem estar relacionados à presença da doença, porém não foram significativamente alterados quando os doentes tuberculóides apresentaram reação hansênica (Figura 10).

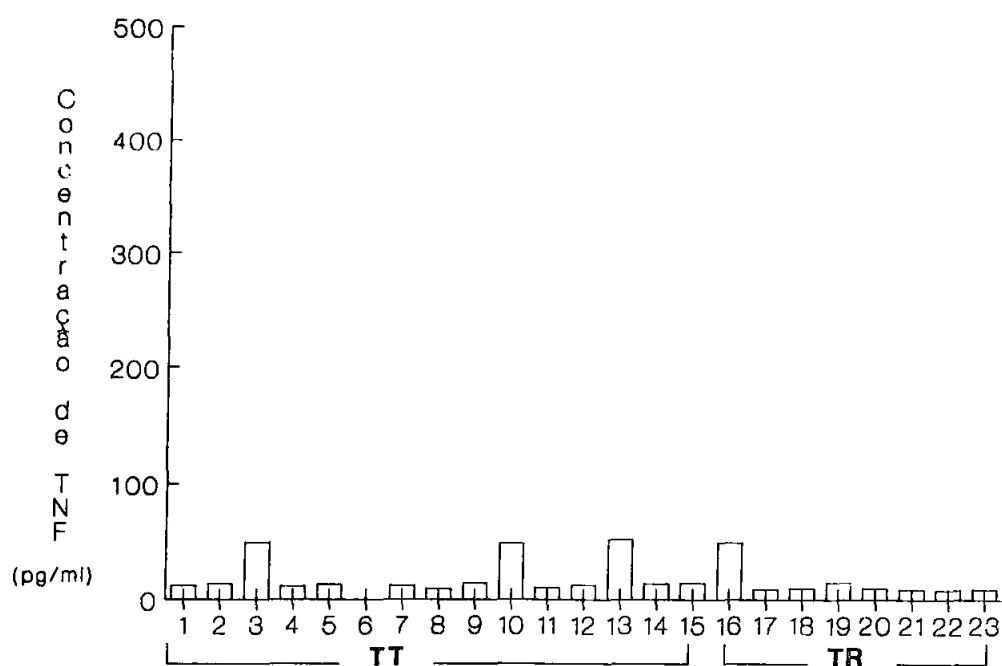


FIGURA 10 - CONCENTRAÇÃO DO FATOR DE NECROSE TUMORAL-TNF (pg/ml) NO SORO DE DOENTES TUBERCULÓIDES.

TT = tuberculóide tórpido

TR = tuberculóide reacional

No grupo controle a determinação de aTNF revelou valores menores e uniformemente distribuídos, média e mediana de 6,9 pg/ml, favorecendo a hipótese de que aTNF não é espontaneamente secretado (Figura 11).

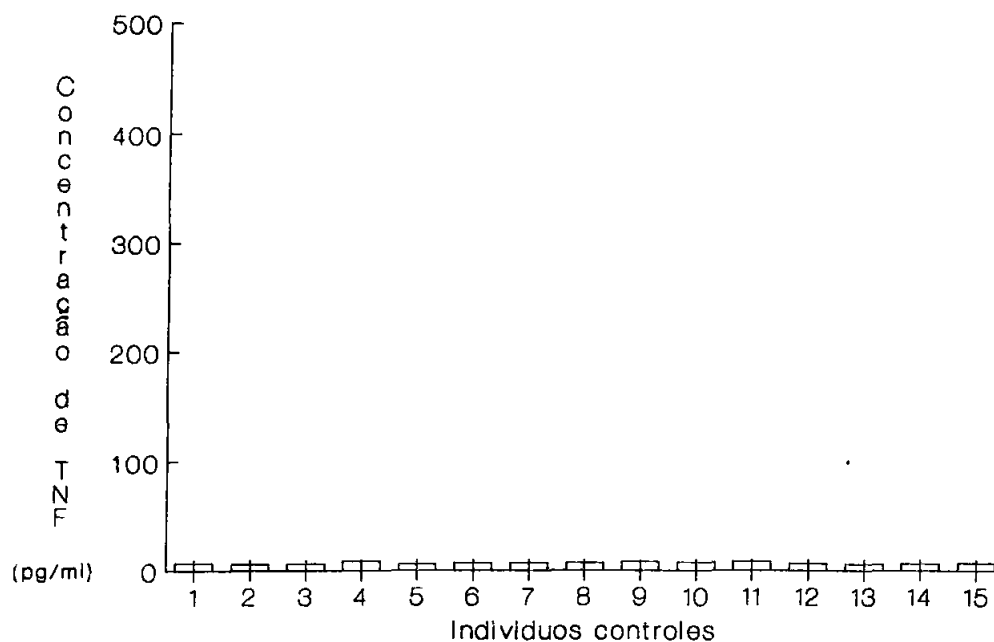


FIGURA 11 - CONCENTRAÇÃO DE FATOR DE NECROSE TUMORAL-TNF (pg/ml) NO SORO DO GRUPO DE CONTROLE.

Utilizou-se o teste de Mann Whitney para a análise estatística destes resultados.

3. Correlação Entre Concentrações Séricas de Proteína-C-Reativa e Fator de Necrose Tumoral

Os resultados das Tabelas VIII e IX sugerem associação entre as concentrações séricas de proteína-C-reativa e aTNF. Esta possível associação se evidencia quando são cotejados os valores observados em virchowianos com e sem reação (Tabela XI).

Para avaliar esta associação utilizou-se o coeficiente de correlação- r (Spearman), que comparou as concentrações séricas de TNF e PCR em cada indivíduo dos grupos estudados.

Em virchowianos (grupo I) encontrou-se associação entre os valores de aTNF e PCR ($r=0,943$) e esta correlação é maior entre os doentes com reação hansênica ($r = 0,982$), muito próximo do valor 1,0, que indica 100% de associação entre os dados, enquanto em pacientes sem reação a correlação é pequena ($r = 0,041$). A correlação positiva entre os dados indica que em virchowianos quando níveis de PCR aumentam há aumento proporcional das concentrações de aTNF.

Em doentes tuberculóides (grupo II) também havia correlação positiva entre níveis séricos de aTNF e PCR, especialmente quando são considerados os resultados de pacientes com reação ($r = 0,884$). O coeficiente de correlação foi menor em tuberculóides sem reação ($r = 0,676$), indicando que existe associação entre níveis séricos de PCR e aTNF em doentes com reação, porém esta associação tende a ser causal quando se considera apenas a forma polar da doença ($r=0,566$).

No grupo controle o coeficiente de correlação ($r=0,4271$) foi positivo sugerindo que em indivíduos normais as concentrações de aTNF e PCR poderiam estar associadas.

4. Resultados da Blastogênese de Linfócitos de Virchowianos

Os resultados da blastogênese de linfócitos de virchowianos, representados pela média das contagens das triplicatas (cpm) e pelos respectivos índices de estimulação (IE= quociente entre o cpm médio das culturas estimuladas pelo cpm médio das culturas controles), das culturas controle (sem estímulo) e estimuladas, encontram-se na Tabela X e Figuras 12 e 13. Considerou-se que $IE > 2,0$ são indicativos de blastogênese.

4.1. Linfoproliferação sob estímulo de fitohemaglutina - PHA

Na Tabela X e Figura 12, observa-se que foi discreta a ação mitogênica da PHA ($M=3,0$) em linfócitos de virchowianos, cultivados em meio de cultura contendo 15% de soro AB inativado pelo calor, apesar de que apenas seis doentes (n^{os}. 11, 14, 19, 20, 21 e 28) apresentaram $IE < 2,0$. Índices elevados ($> 10,0$) foram observados em sete pacientes (n^{os}. 7, 9, 10, 22, 23, 24, 25) sendo que quatro deles estavam em reação (n^{os}. 22, 23, 24, 25).

Considerando separadamente os resultados de virchowianos com ou sem hansênica, nota-se que sob estímulo de PHA as respostas de doentes com e sem reação foram semelhantes ($M = 3,0$ para ambos), Tabela XI e Figura 12.

TABELA X - MÉDIAS DAS CONTAGENS DAS TRIPLICATAS (cpm) E RESPECTIVOS ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DAS CULTURAS CONTROLES E ESTIMULADAS PELA FITOHEMAGLUTININA (PHA) CONCAVALINA-A (Con-A) E PROTEÍNA-CREATIVA (PCR), DO TESTE DE LINFOPROLIFERAÇÃO DE VIRCHOWIANOS.

No. ORDEM	CLASSIFICAÇÃO	CONTROLE		PCR		PHA		PHA + PCR		Con-A		Con-A + PCR	
		cpm	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	
1	V	1548	1858	1,0	4947	3,0	2483	1,5	5587	3,5	3098	2,0	
2	V	1203	1210	1,0	4522	4,0	4515	4,0	9865	8,0	5894	5,0	
3	V	1244	1270	1,0	7588	6,0	5224	4,0	12564	10,0	7340	6,0	
4	V	198	234	1,0	448	2,5	1549	8,0	1164	6,0	847	4,5	
5	V	2254	1536	0,7	4568	2,0	4033	2,0	1109	1,5	2725	1,0	
6	V	2498	1850	0,7	4605	2,0	2958	1,0	4944	2,0	1919	1,0	
7	V	249	229	1,0	3007	12,1	3671	15,0	1264	5,0	944	4,0	
8	V	154	140	1,0	363	2,5	3232	21,0	906	6,0	797	5,0	
9	V	179	196	1,0	1140	1,5	10561	58,0	6167	34,0	1815	21,0	
10	V	201	212	1,0	2995	11,0	8614	41,0	1187	11,0	1182	1,0	
11	V	1260	530	0,5	2500	2,0	1187	0,7	15002	11,2	562	0,5	
12	V	1274	7334	6,0	3274	3,0	9373	7,4	3348	2,5	6564	5,0	
13	V	1880	3840	2,0	3881	2,0	3171	1,7	1820	1,0	1753	1,0	
14	V	642	1333	2,0	943	1,5	2249	3,5	817	1,5	988	1,5	
15	V	521	213	0,5	1448	3,0	718	1,5	1203	2,5	228	0,5	
16	V	373	377	1,0	1427	4,0	519	1,5	1297	3,5	371	1,0	
17	V	315	193	0,6	1416	4,5	652	2,0	1461	4,5	470	1,5	
18	V	1019	1089	1,0	2097	2,0	1181	1,0	1302	1,5	779	0,8	
19	Vr	1309	2094	1,5	2080	1,5	1299	1,0	3194	2,5	1631	1,2	
20	Vr	2737	4927	1,8	3842	1,4	4387	1,6	12823	5,0	3897	1,5	
21	Vr	898	1257	1,4	1347	1,5	1706	2,0	7543	8,5	4221	4,5	
22	Vr	155	171	1,0	9238	59,5	9387	60,0	3496	22,5	2419	15,5	
23	Vr	179	170	1,0	9487	53,0	7894	44,0	4986	28,0	2650	15,0	
24	Vr	132	137	1,0	6996	53,0	6910	52,5	2686	20,0	2917	22,0	
25	Vr	235	190	1,0	14128	60,0	13722	58,0	7722	33,0	7153	30,0	
26	Vr	1270	2600	2,0	2650	2,0	2900	2,5	16340	13,0	2900	2,3	
27	Vr	1638	7780	5,0	4719	3,0	7888	5,0	3646	2,0	3570	2,0	
28	Vr	1139	1188	1,0	1708	1,5	1213	1,0	1722	1,5	1160	1,0	
29	Vr	391	153	0,5	1208	3,0	471	1,0	1434	3,5	180	0,5	
30	Vr	279	308	1,0	1273	4,5	277	1,0	1209	4,0	435	1,5	
MEDIANA				1,0		3,0		2,3		4,8		2,0	

TABELA XI - ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO, CONCENTRAÇÕES SERICAS DE PROTEÍNA-C-REATIVA E TNF EM VIRCHOWIANOS SEM E COM REAÇÃO HANSÊNICA.

No.	ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO					PCR soro (mg/dl)	TNF (pg/dl)
	PCR	PHA	PHA+PCR	Con-A	Con-A+PCR		
ORDEM							
V1	1,0	3,0	1,5	3,5	2,0	0,60	9,2
V2	1,0	4,0	4,0	8,0	5,0	0,60	8,8
V3	1,0	6,0	4,0	10,0	6,0	0,65	8,0
V4	1,0	2,5	8,0	6,0	4,5	0,60	7,5
V5	0,7	2,0	2,0	1,5	1,0	0,80	12,2
V6	0,7	2,0	1,0	2,0	1,0	0,60	8,2
V7	1,0	12,1	15,0	5,0	4,0	0,60	8,4
V8	1,0	2,5	21,0	6,0	5,0	0,70	9,7
V9	1,0	17,5	59,0	34,0	21,0	0,60	8,2
V10	1,0	13,0	43,0	17,0	7,0	0,80	7,6
V11	0,5	2,0	0,7	11,2	0,5	0,80	10,1
V12	6,0	3,0	7,4	2,5	5,0	0,70	7,1
V13	2,0	2,0	1,7	1,0	1,0	0,60	7,6
V14	2,0	1,5	3,5	1,5	1,5	0,95	7,1
V15	0,5	3,0	1,5	2,5	0,5	0,80	7,1
V16	1,0	4,0	1,5	3,5	1,0	0,65	9,3
V17	0,6	4,5	2,0	4,5	1,5	0,63	8,3
V18	1,0	2,0	1,0	1,5	0,8	0,70	7,4
MEDIANA	1,0	3,0	2,8	4,0	2,8	0,65	8,2
Vr1	1,5	1,5	1,0	2,5	1,2	3,00	142,0
Vr2	1,8	1,4	1,6	5,0	1,5	8,00	417,3
Vr3	1,4	1,5	2,0	8,5	4,5	9,40	454,9
Vr4	1,0	59,5	60,0	22,5	15,5	4,00	197,5
Vr5	1,0	53,0	44,0	28,0	15,0	3,00	114,3
Vr6	1,0	53,0	52,5	20,0	22,0	1,70	57,0
Vr7	1,0	60,0	58,0	33,0	30,0	1,80	57,2
Vr8	2,0	2,0	2,5	13,0	2,3	1,20	58,2
Vr9	5,0	3,0	5,0	2,0	2,0	2,42	111,4
Vr10	1,0	1,5	1,0	1,5	1,0	3,96	186,8
Vr11	0,5	3,0	1,0	3,5	0,5	1,20	49,0
Vr12	1,0	4,5	1,0	4,0	1,5	2,12	68,6
MEDIANA	1,0	3,0	2,3	6,8	2,0	2,17	112,91

V = VIRCHOWIANO SEM REAÇÃO

Vr = VIRCHOWIANO COM REAÇÃO

4.2. I.infoproliferação sob estímulo de PHA e proteína-C-reativa - PCR

A adição de PCR As culturas estimuladas pela PHA parece que tende a diminuir a ação mitogênica da PHA, na maioria dos virchowianos (Tabela X e Figura 12), cujas medianas foram para PHA = 3,0 e PHA + PCR. = 2,3.

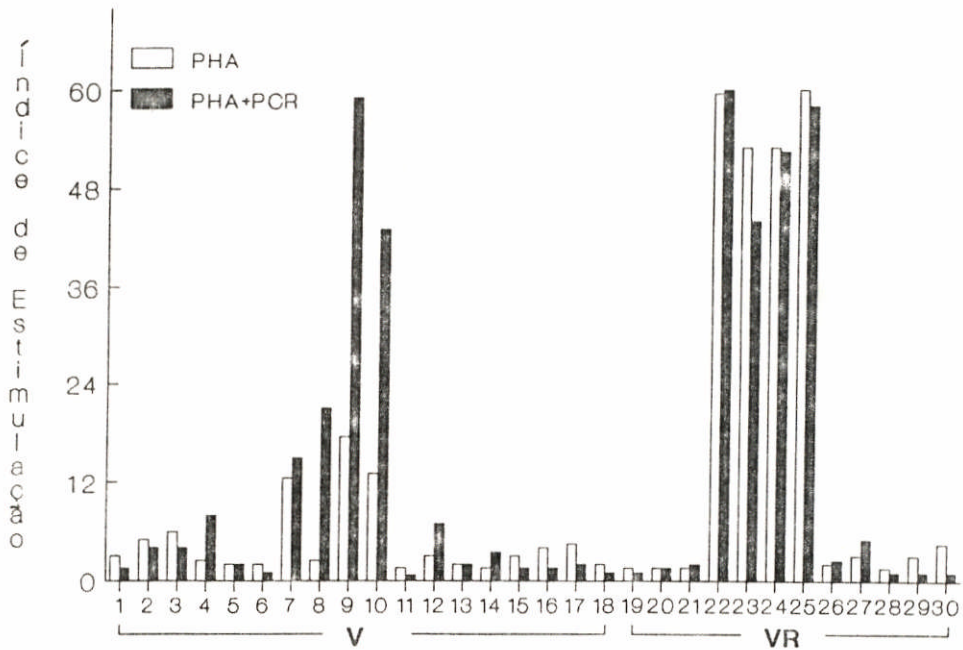


FIGURA 12 - ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO DAS RESPOSTAS LINFOPROLIFERATIVAS DE VIRCHOWIANOS (V) E VIRCHOWIANOS REACIONAIS (VR), ESTIMULADAS PELA FITOHEMAGLUTININA (PHA) E PHA ASSOCIADA À PROTEÍNA-C-REATIVA (PHA+PCR).

Observando isoladamente o comportamento dos linfócitos diante dos estimulantes, nota-se que a maioria tende à depressão de resposta na presença de PCR, com exceção de 8 pacientes (n^{os}. 4, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 27) que até triplicaram os índices de estimulação na presença de PCR.

A análise estatística (Wilcoxon), delineada para avaliar os resultados de cada indivíduo em situações diferentes, por exemplo paciente na 1 resultado das culturas estimuladas pela PHA e pela PHA + PCR, revelou que as diferenças entre os dois estímulos não são significantes ($z=0,83$; $p=0,2033$), ou seja, foi semelhante a blastogênese na presença de PHA e de PHA + PCR.

Em virchowianos com reação os índices de estimulação foram discretamente menores na presença de PCR, sendo as respectivas medianas $M=2,8$ e $M=2,3$ para PHA e PHA+PCR. Nos sem reação ($M=3,0$) os índices foram iguais, permanecendo inalterados pela adição de PCR, o que sugere que PCR não interferiu com atividade mitogênica, induzida pela PHA, de linfócitos de virchowianos reacionais ou não, (Tabela XI e Figura 12). A análise estatística destes dados mostrou que a adição de PCR, à cultura de linfócitos estimulados pela PHA, não interfere com a resposta de virchowianos reacionais ($z = 1,41$; $p = 0,0793$) e não reacionais ($z = 0,11$; $p = 0,4562$).

4.3. Linfoproliferação Sob Estímulo da Concanavalina-A - ConA

A observação geral dos resultados da atividade blástica estimulada

pela ConA mostra que linfócitos de virchowianos tendem a ser mais reativos a este mitógeno (Tabela X e Figura 13), porém com menor amplitude de variação, resultando em mediana maior (M=4,8) que a induzida pela PHA (M=3,0).

Observa-se ainda (Tabela X), comparando-se as respostas pela PHA e ConA, que 13 pacientes obtiveram índices maiores pela ConA (nos. 1, 2, 3, 4, 8, 9, 10, 11, 19, 20, 21, 26, 29) e em outros 13 doentes houve redução dos IE na presença de ConA (nos. 5, 7, 12, 13, 15, 16, 18, 22, 23, 24, 25, 27, 30), enquanto não houve alteração da resposta em apenas quatro virchowianos (n^os. 6, 14, 17 e 28).

Virchowianos não reacionais obtiveram respostas mitogênicas menores (M=4,0) quando comparadas às dos doentes com reação (M=6,8), indicando que durante a reação hansênica existe, em virchowianos, ultra tendência a maior atividade linfoproliferativa estimulada pela ConA. (Tabela XI e Figura 13).

4.4. Linfoproliferação pela ConA e PCR

Na Tabela X e Figura 13 observa-se que a adição de PCR reduziu de 58% a resposta mitogênica da ConA em todos os virchowianos, exceção do paciente n^o 12.

A adição de PCR às culturas estimuladas pela ConA reduziu a atividade blástica de M=4,8 para M= 2,0, o que indica que proteína-C-reativa

reduz a linfoproliferação induzida pela ConA.

Esta depressão de blastogênese induzida pela adição de PCR às culturas de linfócitos de virchowianos estimulados pela ConA, foi analisada estatisticamente (Wilcoxon) e revelou que proteína-C-reativa reduziu significativamente a resposta linfoproliferativa de virchowianos ($z = 4,21$; $p \leq 0,000003$).

Adicionalmente, foi encontrado que a associação de PCR às culturas estimuladas pela ConA, reduziu também as respostas de virchowianos com e sem reação hansênica. Observa-se na Tabela XI que virchowianos sem e com reação apresentavam medianas de 4,0 e 6,8 sob estímulo da ConA, a adição de PCR reduziu estas medianas para 2,8 e 2,0 respectivamente. Pela análise estatística (Wilcoxon) comprovou-se que esta redução é significativa em doentes sem reação ($z = 2,98$; $p \leq 0,0014$) e com reação ($z = 3,06$; $p \leq 0,0011$). Logo, proteína-C-reativa tem capacidade supressora da atividade blastogênica de linfócitos de virchowianos estimulados pela ConA.

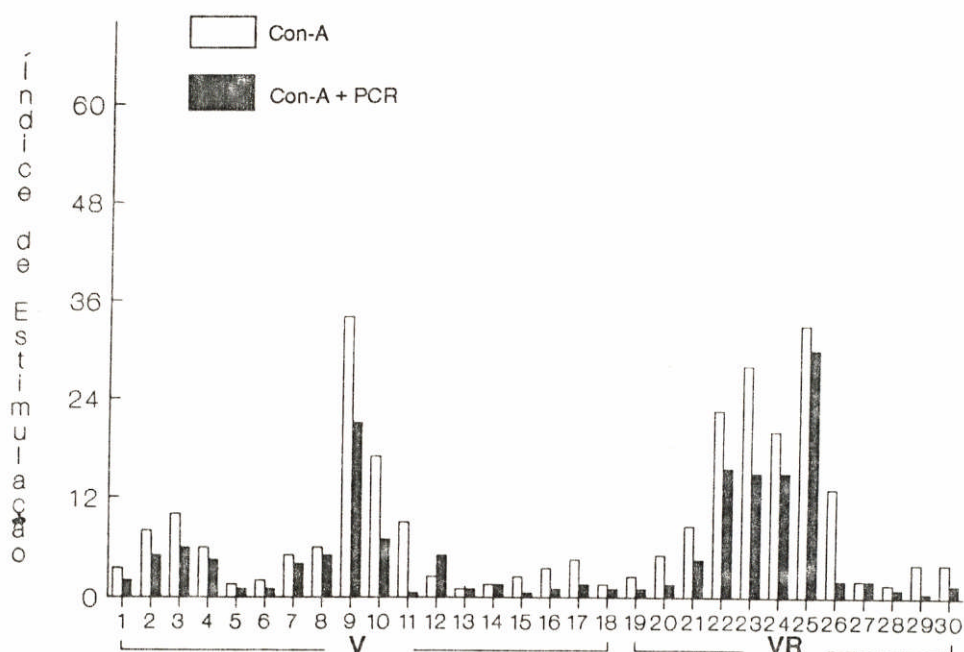


FIGURA 13 - ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO DAS RESPOSTAS LINEOPROLIFERATIVAS DE VIRCHOWIANOS (V) E VIRCHOWIANOS REACIONAIS (VR), ESTIMULADAS PELA CONCAVALINA-A (Con-A) E Con-A ASSOCIADA À PROTEÍNA-C-REATIVA (ConA+PCR).

4.5. Linfoproliferação Estimulada pela Proteína-C-Reativa - PCR

Nas Tabelas X e XI nota-se que PCR não altera a atividade blastogênica de linfócitos de virchowianos, pois as respostas das culturas estimuladas pela PCR são semelhantes das culturas controles.

Linfócitos de doentes com e sem reação hansênica respondem de modo semelhante quando estimulados pela PCR (medianas iguais, $M=1,0$), o que sugere que, na concentração utilizada, PCR não tem atividade blastogênica ou tóxica na linfoproliferação de virchowianos.

4.6. Correlação Entre Índices de Estimulação e Concentração Sérica de PCR

Para verificar se os resultados da linfoproliferação estavam relacionados aos níveis séricos de PCR, calculou-se o coeficiente de correlação- r (Spearman) entre índices de estimulação e níveis de PCR sérico. Foram obtidos valores de r não significantes, logo os resultados da blastogênese não se correlacionam com as concentrações séricas de PCR.

TABELA XII - COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO (L) ENTRE ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO E PCR SÉRICO

	IE	PHA	PHA + PCR	ConA	ConA + PCR
PCR					
	$r = -0,1492$	$r = -0,0179$	$r = -0,2618$	$r = 0,0724$	
mg/dl	$z = -0,6153$	$z = -0,059$	$z = -1,079$	$z = 0,2402$	
	$p = 0,2676$	$p = 0,4761$	$p = 0,1401$	$p = 0,1503$	

5. Resultados da Blastogênese de Linfócitos de Doentes Tuberculóides

Os resultados da blastogênese de linfócitos de doentes tuberculóides encontram-se na Tabela XIII e Figuras 14 e 15.

5.1. Linfoproliferação sob estímulo de PHA

A maioria dos doentes tuberculóides respondeu ao estímulo do PHA

com índices $> 2,0$ ($M= 5,0$), apenas quatro pacientes (nas. 3, 11, 12 e 22) obtiveram índices $< 2,0$, como se verifica na Tabela XIII e Figura 14.

Quando o grupo II foi dividido segundo a presença de reação hansênica (Tabela XIV, observou-se que os tuberculóides sem reação apresentaram linfoproliferação maior ($M=8,0$) que pacientes com reação ($M=3,8$), o que pode sugerir que a reação deprime a resposta proliferativa de linfócitos de doentes tuberculóides estimulados pela PHA.

5.2. Linfoproliferação sob estímulo de PHA e PCR

A análise global dos resultados da blastogênese de doentes tuberculóides (Tabela XIII e Figura 14) revela que quando se adicionou PCR às culturas estimuladas pela PHA, as medianas foram $M=5,0$ e $M=6,5$, pelas estimulações com PHA e PHA+PCR, respectivamente. A análise estatística destes dados (Wilcoxon) revelou que sob estímulo de PHA e de PHA associada à PCR a atividade blastogênica de linfócitos de tuberculóides foi semelhante ($z = 0$; $p \leq 0,500$).

Considerando a resposta dos doentes sem e com reação hansênica (Tabela XIV), observa-se que a adição de PCR às culturas destes grupos tende a modificar a resposta linfoproliferativa, elevando as medianas de 8,0 para 10,0 nos pacientes que não apresentavam reação hansênica e de 3,8 para 4,5 naqueles que estavam com reação.

Entretanto, pela análise estatística (Wilcoxon), não foi comprovado

que PCR exerça efeito indutor de blastogênese em culturas de linfócitos de tuberculóides estimulados pela PHA, sendo não significantes as diferenças observadas na ausência ($z = 0,06$; $p < 0,4761$) e na presença de reação hansênica ($z = 0,28$; $p \leq 0,3897$).

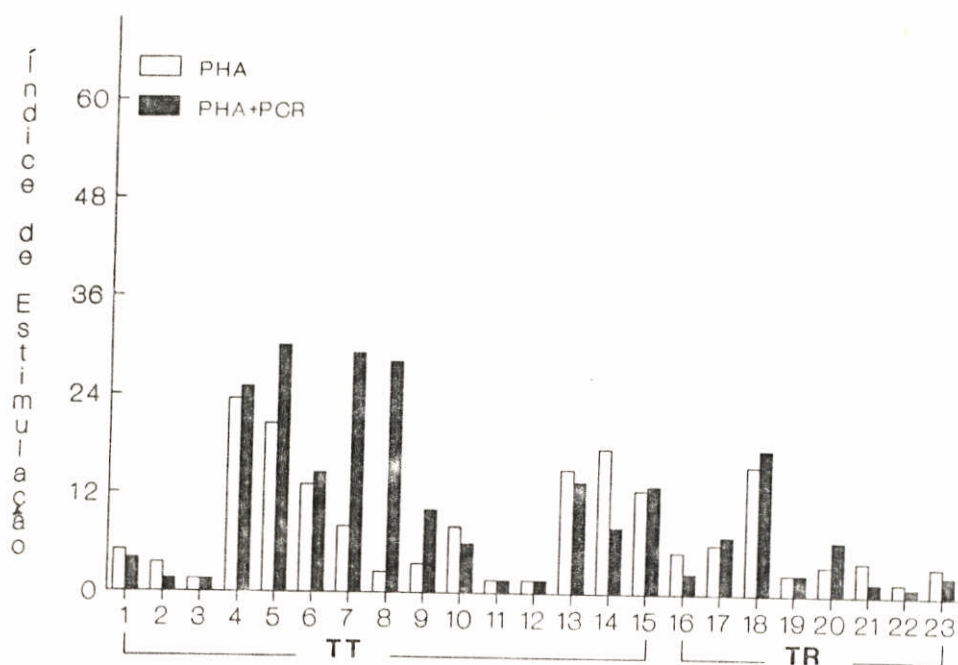


FIGURA 14 - ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO DAS RESPOSTAS LINFOPROLIFERATIVAS DE DOENTES TUBERCULÓIDES TÓRPIDOS (TT) E REACIONAIS (TR), ESTIMULADAS PELA FITOHEMAGLUTININA (PHA) E PHA ASSOCIADA . PROTEÍNA-C-REATIVA (PHA+PCR).

5.3. Linfoproliferação sob estímulo da ConA

Sob estímulo da ConA a resposta linfoproliferativa da maioria dos doentes tuberculóides (19) foi eficiente, índices $> 2,0$, apresentando valor médio $M=4,0$. Quatro doentes apenas apresentaram índices $< 2,0$ (nas. 2, 11, 12, 22), (Tabela XIII e Figura 15).

Nos tuberculóides tórpidos a proliferação linfática tende a ser maior ($M=3,5$) que nos reacionais ($M= 2,5$), indicando que o estado de reação hansênica pode deprimir a resposta imunecelular induzida pela ConA em doentes tuberculóides, (Tabela XIV e Figura 15).

5.4. Linfoproliferação sob estímulo da ConA e PCR

Na Tabela XIII e Figura 15 nota-se que quando se adiciona PCR às culturas de linfócitos de doentes tuberculóides estimulados pela ConA, a resposta linfoproliferativa tende a diminuir ($M=3,0$) e esta redução foi estatisticamente significativa ($z = 2,92$; $p \leq 0,0018$), demonstrada pelo teste de Wilcoxon, no qual se comparou individualmente as respostas para ConA e ConA + PCR, sugerindo que PCR reduz a atividade mitogênica induzida pela ConA em pacientes do grupo II.

Analisando a influência da reação hansênica sobre a blastogênese estimulada pela ConA + PCR (Tabela XIV), foi encontrado que PCR tende a

reduzir a atividade blástica induzida pela ConA em tuberculóides sem e com reação hansênica (respectivas medianas: 3,0 e 2,3), sendo que a depressão da resposta de tuberculóides sem reação foi estatisticamente significativa ($z = 2,44$; $p \leq 0,0073$) e dos reacionais não significativa ($z = 0,98$; $p \leq 0,1635$).

Estes resultados sugerem que PCR reduz a blastogênese estimulada pela ConA, porém não interfere na resposta de doentes tuberculóides com reação.

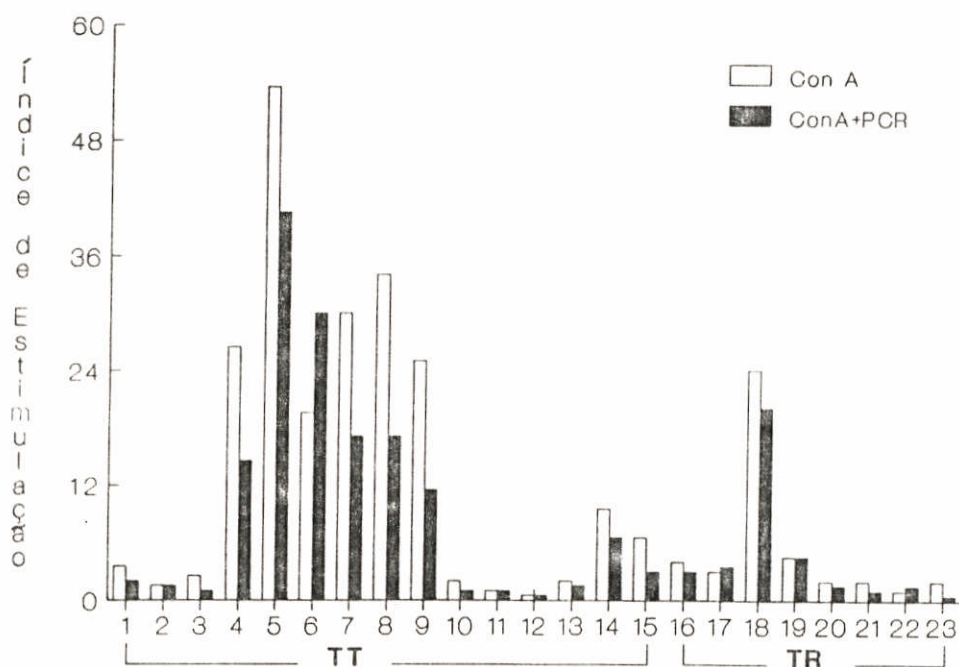


FIGURA 15 - ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO DAS RESPOSTAS LINPOPROLIFERATIVAS DE TUBERCULÓIDES TÓRPIDOS (TT) E REACIONAIS (TR), ESTIMULADAS PELA CONCAVALINA-A (Con-A) E PELA Con-A ASSOCIADA À PROTEÍNA-C-REATIVA (CONA+PCR).

TABELA XIII - MÉDIAS DAS CONTAGENS DAS TRIPLICATAS (cpm) E RESPECTIVOS INDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DAS CULTURAS CONTROLES E ESTIMULADAS PELA FITOHEMAGLUTININA (PHA) CONCAVALINA-A (Con-A) E PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR), DO TESTE DE LINFOPROLIFERAÇÃO DE TUBERCULÓIDES.

No.	CLASSIFICAÇÃO	CONTROLE		PCR		PHA		PHA + PCR		Con-A		Con-A + PCR	
		cpm	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	
1	T	2026	3822	2,0	10129	5,0	6431	3,0	5644	2,8	4488	2,0	
2	T	2263	2275	1,0	7882	3,5	2878	1,5	3826	1,7	3483	1,5	
3	T	1954	1246	0,5	3030	1,5	2756	1,5	2454	2,5	1462	1,0	
4	T	154	282	2,0	3064	23,5	3866	25,0	4112	26,5	2270	14,5	
5	T	200	170	1,0	4059	20,5	6040	30,0	10747	53,5	8087	40,5	
6	T	180	179	1,0	2415	13,4	2642	14,5	3510	19,5	9880	54,8	
7	T	329	242	0,5	2677	8,0	9568	29,0	9880	30,0	5642	17,0	
8	T	209	207	1,0	612	2,5	5847	28,0	7135	34,0	3559	17,0	
9	T	231	300	1,5	767	3,5	2306	10,0	5874	25,0	2606	11,5	
10	T	1987	1490	1,0	16021	8,0	12121	6,0	3925	2,0	2433	1,2	
11	T	876	1229	1,5	1173	1,5	1213	1,5	908	1,0	867	1,0	
12	T	789	912	1,0	1034	1,5	1127	1,5	463	0,5	563	0,5	
13	T	853	829	1,0	12968	15,0	11711	13,5	1793	2,0	1143	1,5	
14	T	1406	4696	3,5	24380	17,5	11248	8,0	13371	9,5	9041	6,5	
15	T	1538	4983	3,0	19502	12,5	19932	13,0	9935	6,5	4399	3,0	
16	Tr	1600	1752	1,0	8275	5,0	3861	2,5	6291	4,0	4952	3,0	
17	Tr	167	159	1,0	1038	6,0	1177	7,0	530	3,0	545	3,5	
18	Tr	146	137	1,0	2232	15,5	2543	17,5	3506	24,0	2910	20,0	
19	Tr	251	166	0,5	570	2,5	573	2,5	1088	4,5	1176	4,5	
20	Tr	1472	1322	1,0	4990	3,5	9568	6,5	3032	2,0	3756	1,5	
21	Tr	1235	2524	2,0	4885	4,0	2077	1,5	2160	2,0	1435	1,0	
22	Tr	237	265	1,0	315	1,5	230	1,0	258	1,0	296	1,5	
23	Tr	839	822	1,0	3071	3,5	1938	2,5	1790	2,0	549	0,5	
MEDIANA				1,0		5,0		6,5		4,0		3,0	

T = TUBERCULÓIDE TÓRPIDO

Tr = TUBERCULÓIDE REACIONAL.

TABELA XIV - INDICES DE ESTIMULAÇÃO, CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNA-C-REATIVA E TNF EM TUBERCULÓIDES COM E SEM REAÇÃO HANSÊNICA.

Nº	Índices de Estimulação					PCR soro	TNF
	PCR	PHA	PHA+PCR	Con-A	Con-A+PCR	(mg/dl)	(pg/dl)
T1	2,0	5,0	3,0	2,8	2,0	0,70	12,2
T2	1,0	3,5	1,5	1,5	1,7	0,65	13,5
T3	0,5	1,5	1,5	2,5	1,0	0,60	11,3
T4	2,0	23,5	25,0	26,5	14,5	0,80	-
T5	1,0	20,5	30,0	53,5	40,5	0,60	12,3
T6	1,0	13,4	14,5	19,5	54,8	0,65	14,3
T7	0,5	8,0	29,0	30,0	17,0	0,80	48,9
T8	1,0	2,5	28,0	34,0	17,0	0,80	12,4
T9	1,5	3,5	10,0	25,0	11,5	3,00	52,0
T10	1,0	8,0	6,0	2,0	1,2	0,65	14,0
T11	1,5	1,5	1,5	1,0	1,0	0,60	8,9
T12	1,0	1,5	1,5	0,5	0,5	0,80	9,7
T13	1,0	15,0	13,5	2,0	1,5	1,40	10,0
T14	3,5	17,5	8,0	9,5	6,5	0,60	8,5
T15	3,0	12,5	13,0	6,5	3,0	0,70	8,4
<hr/>							
MEDIANA	1,0	8,0	10,0	3,5	3,0	0,70	12,3
<hr/>							
Tr1	1,0	5,0	2,5	4,0	3,0	1,00	49,0
Tr2	1,0	6,0	7,0	3,0	3,5	0,60	13,2
Tr3	1,0	15,5	17,5	24,0	20,0	0,60	9,5
Tr4	0,5	2,5	2,5	4,5	4,5	0,80	10,3
Tr5	1,0	3,5	6,5	2,0	1,5	0,80	14,2
Tr6	2,0	4,0	1,5	2,0	1,0	0,95	49,2
Tr7	1,0	1,5	1,0	1,0	1,5	0,80	15,1
Tr8	1,0	3,5	2,5	2,0	0,5	0,70	8,9
<hr/>							
MEDIANA	1,0	3,8	4,5	2,5	2,3	0,75	13,7

V = VIRCHOWIANO SEM REAÇÃO

Vi = VIRCHOWIANO COM REAÇÃO

5.5. Linfoproliferação sob estímulo de PCR

Proteína-C-reativa não interferiu com a resposta linfoproliferativa de doentes tuberculóides, como pode ser observado nas Tabelas XIII e XIV. Linfócitos de pacientes do grupo II, com ou sem reação hansênica, reagiram sob estímulo de PCR de modo semelhante às culturas controles (sem estímulo), sendo suas medianas iguais e de valor 1,0.

5.6. Correlação entre índices de estimulação e concentração sérica de PCR

Calculou-se o coeficiente de correlação, (Spearman), para observar se poderia existir correlação entre as concentrações séricas de PCR e resposta blastogênica para cada estimulante utilizado.

Foi observado que não há correlação entre índices de estimulação pela PHA e níveis de PCR sérico ($r = 0,2977$; $z = 1,1139$; $p \leq 0,1292$), enquanto sob estímulo de PHA + PCR os índices de estimulação estão negativamente correlacionados com níveis de PCR ($r = -0,6667$; $z = -1,7639$; $p \leq 0,0392$) significativa a 5%.

A estimulação pela ConA não se correlaciona com PCR sérico ($r = 0,1102$; $z = 0,4124$; $p \leq 0,3409$), assim como os índices de estimulação obtidos pela ação de ConA + PCR ($r = -0,3458$; $z = -0,9149$; $p \leq 0,1814$).

6. Resultados da Blastogênese de linfócitos do Grupo Controle

Na Tabela XV e Figuras 16 e 17 encontram-se os resultados da blastogênese de linfócitos de indivíduos normais, cultivados em meio de cultura contendo 15% de soro AB normal inativado pelo calor.

6.1. Linfoproliferação sob estímulo de PHA

Inicialmente observa-se na Tabela XV e Figura 16 que linfócitos de todos indivíduos normais (grupo III) responderam à PI-IA com índices $> 2,0$, a maioria maior que 10,0, apenas seis obtiveram $1E < 10,0$, sendo a mediana $M = 15,0$.

Estes resultados mostram que linfócitos de indivíduos normais foram mais proliferativos ao mitógeno PHA do que as células T dos doentes de hanseníase.

6.2. Linfoproliferação sob estímulo de PHA e PCR

A análise da Tabela XV e Figura 16 mostra que, tende a ser semelhante a linfoproliferação de indivíduos normais sob estímulo de PHA (M= 15,0) e PHA + PCR (M= 15,0).

Na Figura 16 nota-se que adição de PCR às culturas estimuladas pela PHA, aumentou a resposta blastogênica de alguns indivíduos (nos. 1, 2, 3, 11, 15) e reduziu a de outros também (nº 12, 13, 14, 16, 17), ocorrendo uma compensação entre as variações de maneira que o valor mediano permaneceu inalterado.

Comparando-se estes dados pela análise estatística (Wilcoxon), foi observado que os resultados da estimulação pela PHA e PHA + PCR são iguais ($z = 1,05$; $p \leq 0,1492$).

Na Tabela XVI e Figura 16 nota-se que linfócitos de indivíduos controles Mitsuda negativos foram mais reativos à PHA (M=21.8) que os Mitsuda positivos (M=14). A adição de PCR às culturas deprimiu em 47% a linfoproliferação induzida pela PHA em indivíduos Mitsuda-negativos (M=10,3); enquanto nos Mitsuda - positivos, ao contrário, houve 53% da estimulação blastogênica

(M= 21,5) induzida pela PHA.

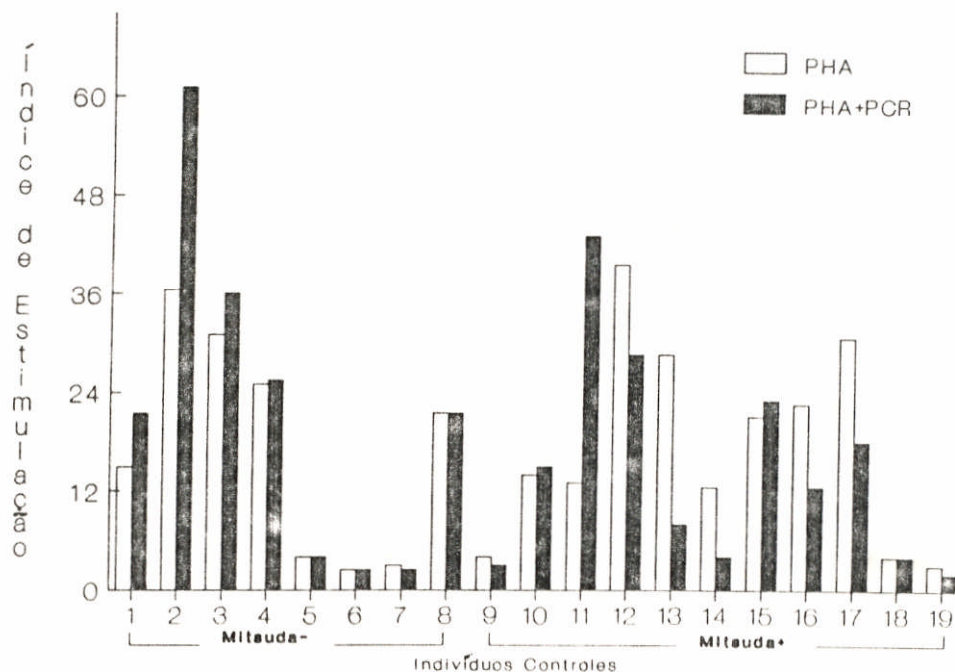


FIGURA 16 - ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO DAS RESPOSTAS LINFOPROLIFERATIVAS DOS INDIVÍDUOS CONTROLES, ESTIMULADAS PELA FITOHEMAGLUTININA (PHA) E PHA ASSOCIADA À PROTEÍNA-C-REATIVA (PHA+PCR).

6.3. Linfoproliferação sob estímulo da ConA

A observação da Tabela XV e Figura 17 mostra que a estimulação,

pela Concanavalina A, das culturas de linfócitos do grupo controle foi discreta (MI=3,0), com predomínio de índices <5,0 apenas quatro culturas tiveram índices > 5,0 (nOs. 2,5,10,11).

TABELA XV - MÉDIA DAS CONTAGENS DAS TRIPLICATAS (cpm) E RESPECTIVOS ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO (IE) DAS CULTURAS CONTROLES E ESTIMULADAS PELA FITOR'EMAGLUTININA (PRA) CONCANAVALINA-A (Con-A) E PROTEÍNA-C-REATIVA (PCR) DO TESTE DE LINFOPROLIFERAÇÃO DO GRUPO CONTROLE.

No.	REAÇÃO	CONTROLE	PCR		PHA		PHA+PCR		Con - A		Con - A+PCR	
			cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE
ORDEM	MITSUUDA	cpm	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE	cpm	IE
1	1+	970	1328	1,5	14553	15,0	20644	21,5	2706	3,0	1789	2,0
2	1+	288	746	2,5	10529	36,5	17625	61,0	1478	5,0	808	3,0
3	2+	433	449	1,0	13766	31,0	15521	36,0	1298	3,0	1610	3,5
4	1+	542	443	1,0	13518	25,0	13950	25,5	1674	3,0	498	1,0
5	2+	1043	2505	2,5	4294	4,0	4062	4,0	6367	6,0	4670	4,5
6	2+	2402	2190	1,0	6561	2,7	5730	2,4	11045	4,5	8498	3,5
7	1+	2537	2069	1,0	7114	1,0	6689	2,5	4866	2,0	1048	1,5
8	1+	1720	1713	1,0	36951	21,5	37100	21,5	5218	3,0	5157	3,0
9	2+	2001	2247	1,0	8071	4,0	5600	2,8	6034	3,0	5358	2,5
10	1+	175	189	1,0	2403	14,0	2649	15,0	2082	12,0	1925	11,0
11	1+	270	276	1,0	3565	13,0	11551	43,0	3769	14,0	2604	9,5
12	NEGATIVA	355	1246	3,5	14101	39,5	10201	28,5	1416	4,0	1551	4,5
13	NEGATIVA	548	273	0,5	15517	28,5	4492	8,0	1857	3,5	454	1,0
14	NEGATIVA	996	689	0,5	12460	12,5	4203	4,0	1033	1,0	823	1,0
15	NEGATIVA	383	674	2,0	8024	21,0	8891	23,0	856	2,0	706	2,0
16	NEGATIVA	781	831	1,0	17472	22,5	9928	12,5	1680	2,0	866	1,0
17	NEGATIVA	845	1366	1,5	25491	30,5	15092	18,0	897	1,0	734	1,0
18	NEGATIVA	3251	3598	1,0	12688	4,0	12362	4,0	14609	4,5	12613	4,0
19	NEGATIVA	3530	3476	1,0	9711	3,0	6330	2,0	5789	1,5	3670	1,0
Mediana				1,0		15,0		15,0		3,0		2,0

Mitsuda - 11

Mitsuda - 08

TABELA XVI - ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO, CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE PROTEÍNA-C-REATIVA E TNF NOS CONTROLES MITSUDA NEGATIVOS E POSITIVOS.

No.	ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO					PCR NO SORO	TNF NO SORO	
	PCR	PHA	PHA+PCR	Con·A	Con·A+PCR	mg/dl	mg/dl	
N E G A T I V O S	1	3,5	39,5	28,5	4,0	4,5	0,50	5,7
	2	0,5	28,5	8,0	3,5	1,0	0,65	6,5
	3	0,5	12,5	4,0	1,0	1,0	1,15	8,4
	4	2,0	21,0	23,0	2,0	2,0	0,82	5,8
	5	1,0	22,5	12,5	2,0	1,0	0,65	7,1
	6	1,5	30,5	18,0	1,0	1,0	0,55	6,9
	7	1,0	4,0	4,0	4,5	4,0	0,75	5,8
	8	1,0	3,0	2,0	1,5	1,0	0,60	6,6
Mediana	1,0	21,8	10,3	2,0	1,0	0,73	0,65	
P O S I T I V O S	1	1,5	15,0	21,5	3,0	2,0	0,60	6,9
	2	2,5	36,5	61,0	5,0	3,0	0,61	6,9
	3	1,0	31,0	36,0	3,0	3,5	0,62	8,3
	4	1,0	25,0	25,5	3,0	1,0	0,60	7,4
	5	2,5	4,0	4,0	6,0	4,5	0,91	7,9
	6	1,0	2,7	2,4	4,5	3,5	0,70	6,6
	7	1,0	3,0	2,5	2,0	1,5	0,65	7,0
	8	1,0	21,5	21,5	3,0	3,0	0,60	
	9	1,0	4,0	3,0	2,8	2,5	0,75	
	10	1,0	14,0	15,0	12,0	11,0	0,60	
	11	1,0	13,0	43,0	14,0	9,5	0,65	
Mediana	1,0	14,0	21,5	3,0	3,0	0,70	7,4	

Mitsuda+ = 11
Mitsuda- = 08

Outro aspecto interessante é que sob estímulo da ConA, a resposta proliferativa de linfócitos de indivíduos normais ($M=3,0$) foi menor que a de doentes de hanseníase ($M=4,8$ e $M=4,0$ para virchowianos e tuberculóides, respectivamente), ao contrário da atividade blástica induzida pela PHA, indicando que sob estímulo da ConA linfócitos do grupo controle são menos reativos que linfócitos dos grupos I e II.

6.4. Linfoproliferação sob estímulo da ConA e PCR

Adicionando-se proteína-C-reativa (PCR) às culturas de linfócitos estimuladas pela ConA observa-se na Tabela XV e Figura 17, tendência a redução da resposta bastogênica ($M=2,0$). A maioria dos valores dos IE diminuiu ou permaneceu inalterada pela adição de PCR, apenas dois valores aumentaram discretamente (n^{os}. 3 e 12).

Analisando estatisticamente (Wilcoxon) as diferenças entre estas estimulações, observou-se que PCR diminuiu significativamente a resposta linfoproliferativa de indivíduos normais estimulada pelas ConA ($z = 3,43$; $p \leq 0,00023$).

Proteína-C-reativa foi depressora da atividade linfoblástica estimulada pela ConA nos três grupos estudados, sendo esta depressão mais acentuada nos virchowianos (58%) e aproximadamente igual nos tuberculóides (25%) e controles (30%).

No entanto, se os resultados do grupo controle forem analisados

segundo a resposta da reação de Mitsuda (Tabela XVI e Figura 17), observa-se que os Mitsuda-negativos apresentaram índices menores ($M=2,0$) que os Mitsuda-positivos ($M=3,0$), para a ConA. A associação de PCR As cubaras estimuladas pela ConA reduziu em 50% a linfoproliferação dos indivíduos Mitsuda-negativos ($M=1,0$); enquanto nos Mitsuda-positivos a PCR não alterou a blastogênese induzida pela ConA ($M=3,0$).

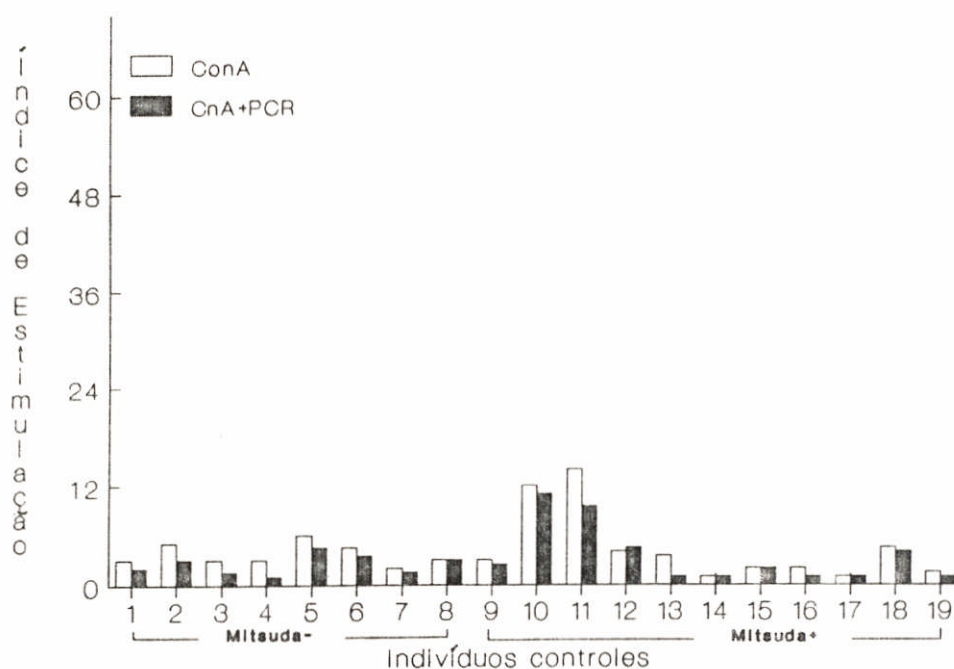


FIGURA 17 - ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO DAS RESPOSTAS LINFOPROLIFERATIVAS DOS INDIVÍDUOS CONTROLES, ESTIMULADAS PELA CONCAVALINA-A (Con-A) E Con- -A ASSOCIADA À PROTEÍNA-C-REATIVA (PHA+PCR).

6.5. Linfoproliferação sob estímulo da PCR

Linfócitos de indivíduos normais, sob estímulo de proteína-C-reativa, apresentaram atividade blástica semelhante às culturas controles, medianas dos IE igual 1,0 (Tabelas XV e XVI), sugerindo que PCR não interfere na atividade blastogênica de linfócitos do grupo controle, assim como dos grupos I e II.

Analisando os resultados da blastogênese segundo os mitógenos, observa-se que a ação mitogênica da PHA foi mais acentuada nos indivíduos controles Mitsuda-negativos (M=21,8), diminuindo nos Mitsuda-positivos (M=14.0), nos doentes tuberculóides tórpidos (M=8.0) e reacionais (M=3.8). Os menores índices de estimulação foram dos pacientes virchowianos, com ou sem reação hansênica (M=3,0).

Com a adição de PCR às culturas estimuladas pela PHA a resposta linfoproliferativa variou segundo a forma da doença e a reação de Mitsuda. Nota-se na Figura 18, que houve tendência à redução de 24% desta resposta em virchowianos reacionais e de 47% nos controles Mitsuda-negativos, enquanto nos tuberculóides e controles Mitsuda-positivos (M+) houve tendência a aumento da blastogênese. A associação de PCR aumentou a proliferação de tuberculóides tórpidos em 25%, dos T reacionais em 18% e dos controles M+ em 53%.

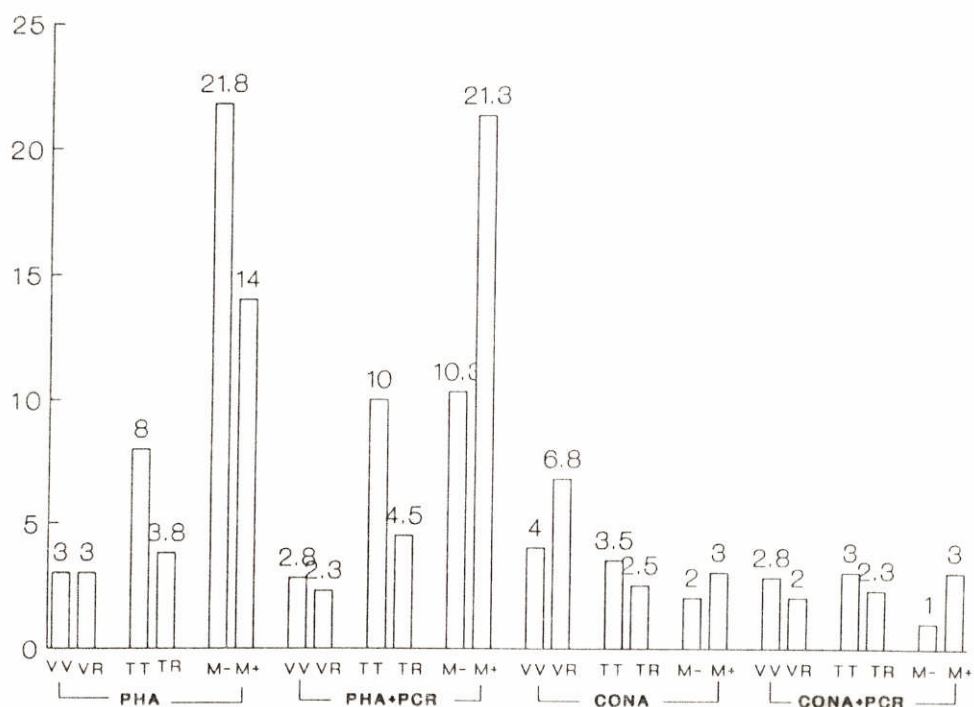


FIGURA 18 - VALORES DAS MEDIANAS DOS ÍNDICES DE ESTIMULAÇÃO SOB ESTÍMULO DE FITOHEMAGLUTININA (PHA), C O NCAVALLNA-A (Con-A) E PROTEÍNA-C-REATIVA (PCP.), EM DOENTES DE HANSENÍASE E INDIVÍDUOS CONTROLES .

VV = virchowianos/ VR= virchowianos reacionais

TT =tuberculóides tórpidos/TR tubereulóides reacionais

M =controle Mitsuda-negativo/M+=controle Mitsuda-positivo

Considerando a atividade do mitógeno ConA observa-se, inicialmente (Figura 18), que a proliferação de de virchowianos foi maior, especialmente nos reacionais (M=6.8 não reacionais M=4,0), comparada à resposta de tuberculóides (tórpidos M=3.5, reacionais M=2.5) e dos controles

(Medianas 2.0 e 3.0 nos M-negativos e positivos, respectivamente). Associando-se PCR a estas culturas houve depressão da proliferação de linfócitos dos três grupos, exceção dos controles Mitsuda-positivos cujas medianas permaneceram inalteradas. Nota-se também que a redução induzida pela PCR foi mais acentuada em virchowianos reacionais (70%) e nos controles Mitsuda-negativos (M=47%).

DISCUSSÃO

Ultimamente tem sido ressaltada a importância da proteína-Creativa (PCR) nos estados reacionais da hanseníase, especialmente na forma virchowiana em reação. É descrito que na reação tipo eritema nodoso (que acomete apenas os virchowianos), há aumento acentuado dos níveis séricos de PCR e que a queda desta proteína pode servir de parâmetro para acompanhar laboratorialmente a involução desta reação imunológica(Languillon, 1986).

Sabe-se, ainda, que PCR é uma proteína clássica da reação inflamatória aguda, que pode ser detectada no soro e que após um estímulo agudo (trauma, infecção) pode variar de concentrações menores que 1,0 mg/ dl (níveis normais) até maiores que 400 mg/dl, em um período de 24-48 horas (Pepys et al., 1983).

Níveis de proteína-C-reativa elevados e persistentes refletem atividade da doença e tem sido relatados em infecções, reações inflamatórias, tumores

e lesões tissulares (Hind et al. 1985).

Os resultados da concentração de PCR no soro dos grupos estudados revelaram que em doentes *Virchowianos* (grupo I) os níveis séricos de PCR estão aumentados ($x = 1,84 \pm 0,39$) em reação ao grupo controle, enquanto nos tuberculóides (grupo II) estes valores tendem a ser semelhantes ao dos controles ($x = 0,86 \pm 0,11$ e $x = 0,68 \pm 0,03$ em tuberculóides e controles, respectivamente). Estes resultados estão de acordo com relato de Languillon (1986) que refere níveis elevados de PCR no eritema nodoso, tipo de reação restrita aos virchowianos.

Na Tabela I nota-se que 40% dos virchowianos (12 doentes), apresentavam reação, com predomínio do tipo eritema nodoso, o que poderia explicar as maiores concentrações de PCR neste grupo.

Portanto, os resultados podem sugerir que o aumento de PCR estaria relacionado à presença do quadro de eritema nodoso em virchowianos.

Confirmando esta sugestão foi observado que as concentrações séricas de PCR em virchowianos reacionais foram significativamente maiores ($x = 3,48 \pm 0,76$) que as do grupo controle ($x = 0,68 \pm 0,03$).

E ainda, comparando os resultados de virchowianos com reação ($M = 2,71$) e sem reação ($M = 0,65$), como mostra a Tabela XL, encontrou-se que os níveis de PCR estão elevados nos virchowianos reacionais, enquanto os não reacionais ($M = 0,65$) tendem a valores semelhantes aos do grupo controle ($M = 0,65$); indicando que a produção e liberação de PCR, na reação do tipo eritema nodoso, poderia ser diretamente influenciada pela reação inflamatória aguda envolvida neste processo.

Kushner et al. (1982a), descreveram que a reação inflamatória

aguda associa-se a uma série de alterações metabólicas e fisiológicas que ocorrem em resposta a traumas, infecções ou inflamações.

Estas alterações, como descrito por Kushner (1982b) e Dinarello (1984), incluem o desenvolvimento de febre, depressão dos níveis séricos dos íons ferro e zinco, distúrbio da neoglicogênese e desvio das prioridades metabólicas do organismo, como redução da produção de proteínas (por ex. albumina) e aumento da formação de proteína da reação inflamatória aguda como PCR.

Desta forma pode ser explicado o quadro clínico que acompanha o eritema nodoso, (reação por imunocomplexo circulante), constituído de febre, nódulos eritematosos, quentes e dolorosos generalizados, adenomegalia, dores articulares, neurites e aumento de PCR sérico (Bechelli, 1951 e Languillon, 1986), por se tratar de unia reação inflamatória aguda com manifestações sistêmicas.

Em *tuberculóides*, entretanto, os níveis de PCR (M= 0,70) foram semelhantes aos do grupo controle (M-0,65), mesmo quando foi considerada a presença de reação (M-0,75), indicando que na hanseníase tuberculóide, a produção de PCR não seria influenciada pela doença ou pelo tipo de reação que acomete estes pacientes.

É conhecido que doentes tuberculóides apresentam reação localizada, com edema e acentuação das lesões, aparecimento ou não de novas lesões, edema de extremidades(mãos, pés. geralmente, caracterizados um quadro típico de reação inume celular bem delimitada.

Pelo tipo de reação inflamatória envolvida na forma tuberculóide, a produção de proteína-C-reatava permaneceria inalterada, o que explicaria os

resultados observados e está de acordo com Languillon (1986) que relata níveis normais de PCR em tuberculóides com reação.

Atualmente existem resultados experimentais evidenciando que a produção de proteína-C-reativa é induzida por IL1, TNF, IL6 ou IL6 e IL1 associadas (Kushner et al., 1989; Taylor et al., 1989 e Yamada et alia, 1990), caracterizando a função reguladora das citocinas.

Determinando a concentração sérica de aTNF nos três grupos estudados, foram encontrados níveis maiores que nos controles (M-6,9 pg/ ml), em soro de tuberculóides (M-12,4) e virchowianos (M-9,4), sugerindo que a infecção pelo M. leprae pode estimular macrófagos a produzirem aTNF e que este estímulo parece ser mais efetivo nos tuberculóides, (Tabela IX e Figuras 9, 10 e 11).

Estes resultados poderiam ser explicados pela indução da produção de citocinas como observado em queimaduras, por Yamada et alai (1990). Na hanseníase a infecção pelo M. leprae provocaria a resposta inflamatória, capaz de induzir a produção de citocinas, numa proporção correspondente à capacidade de ativação macrofágica, que foi mais acentuada em doentes tuberculóides. Estes achados confirmam nosso estudo anterior (Silva & Foss, 1989) onde descrevemos deficiência na produção de aTNF por macrófagos de virchowianos sem reação hansênica, em relação à resposta de tuberculóides e controles.

Entretanto, quando se analisam, separadamente, os resultados de

virchowianos com reação, (Tabela XI) observam-se níveis séricos elevados de aTNF (M=112,9), enquanto os não reacionais apresentaram concentrações menores (M=8,2), sendo ambas maiores que do grupo controle.

Os resultados são muito interessantes, pois evidenciam que a infecção bacilar mantém certa ativação de macrófagos de virchowianos, com produção discreta ou mínima de aTNF. Mas, foi a reação inflamatória aguda da hanseníase virchowiana (eritema nodoso) o processo que realmente estimulou a produção de aTNF.

Sarno et al. (1991) relataram que 50% dos pacientes virchowianos com eritema nodoso apresentavam níveis elevados de aTNF (alguns maiores que 1000 pg/ml) e de IL1, concluindo que aTNF e IL1 podem estar envolvidas na reação hansênica. Nossos resultados em virchowianos com eritema nodoso (Tabela XI), continuam que esta reação cursa com maior produção de aTNF.

Foi observada correlação positiva ($r=0,943$) entre níveis séricos de aTNF e PCR nos virchowianos, isto é, quanto maior a produção de aTNF maior a concentração de PCR, sugerindo que, possivelmente, esta citocina esteja relacionada ao estímulo do hepatócito para produção de PCR (Tabelas VIII, IX, XI e Figuras 6 a 11).

O mecanismo proposto é que macrófagos ativados secretariam citocinas (IL1, aTNF e IL6), que estimulariam linfócitos T (timodependentes) e também hepatócitos. IL6 é o principal ativador do hepatócito para a síntese de proteínas da fase aguda, por exemplo PCR e SAA (Raynes et al., 1991; Yap et al., 1991).

Entretanto, quando se consideram apenas os resultados de

virchowianos sem reação, o coeficiente de correlação entre os níveis de α TNF e PCR cai acentuadamente ($r=0,041$), sugerindo que todo o processo foi desencadeado pela reação inflamatória aguda ($r=0,982$).

A tendência para distribuição casual entre níveis séricos de TNF e PCR ($r=0,565$) em doentes tuberculóides, poderia ser explicada pelas características clínicas desta forma da doença. Nos tuberculóides com reação o coeficiente de correlação é um pouco maior ($r=0,786$), sugerindo que durante o surto reacional houve reação inflamatória que estimulou a produção de citocinas e PCR, em concentrações menores, talvez por ser esta reação mais localizada.

Nesta forma de doença os níveis de produção de α TNF variaram muito pouco com a reação hansênica, assim como as concentrações séricas de PCR. Na Tabela IX observa-se que os maiores níveis de α TNF foram encontrados na presença (pacientes nos. 3 e 16) e na ausência (pacientes nos. 10 e 13) de reação, indicando que a própria infecção seria um dos fatores capaz de ativar macrófagos de tuberculóides levando à produção desta citocina.

No grupo controle, como esperado em indivíduos normais, os níveis séricos de α TNF foram baixos, da mesma forma que as concentrações de PCR, e não se observou correlação significativa entre eles.

A análise global destes resultados destaca a Importância da reação inflamatória aguda (eritema nodoso) da hanseníase virchowiana na

potencialização da resposta macrofágica, capacitando células deficientes na produção de citocinas a produzi-las em níveis elevados, ocorrendo também, produção acentuada de proteína-C-reativa.

Proteína-C-reativa tem sido considerada como mediador pró-inflamatório inespecífico com atividades biológicas definidas, tais como a de:

- a) induzir atividade tumoricida de macrófagos (Zahedi & Mortensen, 1986);
- b) modular a formação de colônias de células precursoras de monócitos e de células B humanas (Mortensen, 1983; Whisler et al., 1983; Whisler et al., 1986);
- c) ligar-se a subpopulações de linfócitos que contenham receptor para Fc da imunoglobulina G (James et al., 1981a e b), assim como aos monócitos (Gewurz, 1982; Zeller et al., 1989) e aos neutrófilos (Mullek et al., 1986; Buchta et al., 1987).

Nos experimentos realizados para se verificar a influência da proteína-C-reativa na resposta linfoproliferativa de doentes de hanseníase e de indivíduos controles não afetados pela doença, observou-se ampla variedade de respostas em cada grupo estudado.

Virchowianos tiveram discreta (M=3,0) resposta linfoproliferativa pela PHA (dose de 20,0 µg/ml) na presença ou não de reação hansênica (Tabelas X, XI e Figura 12), mas observando os índices de estimulação individualmente, nota-se que os *virchowianos* reacionais apresentam índices mais elevados (53.0, 59.5 e 60.0 nos pacientes nº 22, 23, 24 e 25).

A proteína-C-reativa não alterou a resposta linfoproliferativa Induzida pela PHA em *virchowianos* com e sem reação, em níveis de significância estatística, porém os resultados das Tabelas X, XI e Figura 12 mostram que em alguns doentes sem reação (6/18) a PCR tende a aumentar os índices de

estimulação (nos. 4, 8, 9, 10, 12 e 14), enquanto que na metade dos reacionais (6/12) houve diminuição da blastogênese (nos. 23, 24, 25, 28, 29, 30) na presença de PCR. Assim, conclui-se que a resposta linfoproliferativa, induzida pela PHA, em virchowianos não foi alterada pelo surto reacional ou pela associação de proteína-C-reativa às culturas.

. Em *tuberculóides* tórpidos a resposta linfoproliferativa estimulada pela PHA foi maior (M=8,0) do que nos reacionais (M=3,8) e nos virchowianos com e sem reação (M=3,0; Figura 18), indicando que a capacidade de resposta à PHA foi maior em linfócitos de tuberculóides tórpidos, o que está de acordo com resultados já observados por nós (Foss et al, 1977).

Na presença de proteína-C-reativa a resposta linfoproliferativa de doentes tuberculóides foi maior, aumentando em 25% nos tórpidos (M=10,0) e em 18% nos reacionais (M=4,5, Figura 18), sugerindo que PCR tende a elevar a capacidade linfoproliferativa de tuberculóides induzida pela PHA, embora os níveis não sejam de significância estatística.

Estes dados mostram que linfócitos de doentes tuberculóides tórpidos são mais reativos à PHA que os de reacionais e que proteína-Creativa poderia ter ação estimulante da blastogênese induzida por este mitógeno.

Os *controles* Mitsuda-negativos responderam à PHA com índices de estimulação maiores (M=21,8) em relação aos Mitsuda-positivos (M=14,0) e aos pacientes de hanseníase (Figura 18), indicando que linfócitos T de indivíduos não acometidos pela doença apresentam maior potencialidade de blastogênese à PHA; o que pode sugerir que a infecção pelo *M. leprae*, possivelmente, interfere na proliferação linfocitária, reduzindo a potencialidade

de resposta destas células.

Os mecanismos que poderiam explicar esta redução de resposta da célula T não estão completamente esclarecidos. Segundo Godal (1984) a depressão da linfoproliferação de virchowianos localiza-se no linfócito T "helper" (auxiliar), que teria suas funções alteradas por maior atividade das células supressoras ou por menor produção de interleucina -2 (IL2 - fator de crescimento dos linfócitos).

Mehra *et all* (1980) descreveram, em virchowianos, maior atividade de células supressoras (OKT₈⁺) e Haregewoin *et alii* (1983) mostraram que as células T de virchowianos são deficientes na produção de IL2, mas a adição de IL2 às culturas estimuladas pelo M.leprae aumenta a resposta proliferativa ao bacilo.

Por outro lado, observa-se na Figura 18 e Tabela XVI que a atividade da proteína-C-reativa foi oposta no grupo controle, pois reduziu de 47% a resposta dos Mitsuda-negativos (M=10,3) e aumentou 53% a proliferação induzida pela PHA nos Mitsuda-positivos (M=21.5), enquanto nos doentes esta proteína não alterou significativamente a blastogênese induzida pela PHA.

Logo, baseando-se nos resultados obtidos pode-se supor que proteína-C-reativa tende a estimular a blastogênese, induzida pela PHA, de linfócitos de indivíduos Mitsuda-positivos e a reduzir proliferação dos Mitsuda-negativos, porém nos doentes tuberculóides (Mitsuda-positivos) e virchowianos (Mitsuda-negativos) esta atividade não pode ser evidenciada.

Outro achado interessante é que nas culturas de doentes e controles não se observou que a proteína-C-reativa tivesse ação estimuladora ou

depressora da blastogênese de linfócitos (Tabelas XI, XIV e XVI), porque as respostas na presença de PCR foram semelhantes às das culturas controles (sem estímulo); portanto parece que a atividade da PCR estaria, também associada à presença do mitógeno, ou da ativação prévia dos linfócitos T.

O mitógeno concanavalina-A induziu linfoproliferação mais acentuada em *virchowianos* (M= 4,8) que em doentes tuberculóides e no grupo controle (Figura 18). Esta ação estimulante foi maior em linfócitos dos doentes com reação (M= 6,8), demonstrando que linfócitos de *virchowianos* são mais reativos à ConA e a reação de eritema nodoso Intensifica esta reatividade.

A explicação destes achados pode ser baseada no conhecimento de que os mitógenos PHA e ConA têm afinidade por diferentes subpopulações de linfócitos T. A atividade mitogênica da ConA tem sido relacionada à subpopulação de linfócitos T supressores (Shou et al., 1976; Sakane & Greene, 1977). Mehra et al. (1979, 1980 e 1982) descreveram que a supressão na hanseníase é mediada por subpopulação supressora citotóxica Th2⁺ V CD8⁺. Por outro lado, PHA é considerada um bom indutor de proliferação celular "in vitro", especialmente das subpopulações CD3⁺ e CD4⁺ (Rotteveel et al., 1988; Bloemena et al., 1989).

É descrito também (Mehra et al., 1980 e Modin & Rea, 1987), que pacientes *virchowianos* apresentam atividade diferente das subpopulações de linfócitos T, com predomínio de supressores e citotóxicos (CD8⁺) em relação aos auxiliares (CD4⁺), explicando assim, os maiores índices de estimulação encontrados sob estímulo da ConA.

A intensidade de resposta durante a reação hansênica pode ser

relacionada à reação inflamatória aguda desencadeada pelo eritema nodoso, com liberação de interleucinas e conseqüente ativação de linfócitos T, potencializando a resposta mitogênica sobre uma população de células proporcionalmente mais ativa.

Entretanto, quando foi acrescentada PCR às culturas de virchowianos estimuladas pela ConA observou-se redução acentuada (58,4%) da linfoproliferação estimulada pelo mitógeno, especialmente quando se considera a presença de reação hansênica na qual houve depressão de 70% de blastogênese induzida pela ConA. (Figuras 13 e 18).

Estes resultados são muito interessantes porque revelam atividade redutora de blastogênese, específica à subpopulação supressora citotóxica, estimulada pela ConA. Esta especificidade poderia ser explicada pelas hipóteses:

a) Modificação do comportamento de linfócitos T, alterando sua capacidade de resposta imunecelular, como relata Gotschlich (1989) que PCR. mortifica o comportamento de células efetoras, principalmente leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, monócitos e plaquetas.

b) Os receptores dos (linfócitos?supressores/citotóxicos teriam possibilidade de reconhecer a PCR que seria então fixada à parede das células impedindo a ação da ConA.

c) Proteína-C-reativa poderia reagir quimicamente com concanavalina - A formando um produto diferente, não reconhecido pelas células T, diminuindo, portanto, a resposta blastogênica.

Apesar de especulativas as hipóteses b e c podem ser consideradas para explicar os resultados.

Deve ser ressaltado que PCR pura, na cultura de linfócitos de virchowianos, não exerceu qualquer das atividades estimulante ou supressora, o que indica que as alterações descritas com a estimulação pela ConA são

realmente específicas.

Portanto, o conjunto de alterações observadas em doentes virchowianos revelou que a reação de eritema nodoso é foco de desenvolvimento das alterações imunológicas, caracterizada laboratorialmente por elevação de α TNF e PCR séricos, associado com maior resposta proliferativa de linfócitos estimulados pela ConA, mas a proteína-C-reativa parece ter importante ação na modulação desta resposta, deprimindo a atividade de linfócitos T supressores. É importante destacar também, que a resposta celular de virchowianos é mais acentuada na subpopulação de linfócitos estimulados pela ConA.

Sendo a população de células T supressoras/ citotóxicas (estimulada pela ConA.) a que mais responde no teste de linfoproliferação de virchowianos, provavelmente seja este um dos fatores envolvidos na evolução crônica e insidiosa da hanseníase virchowiana, pois, como é conhecido, as células T supressoras bloqueiam a produção e a expressão dos receptores de 1L2 na superfície de linfócitos T auxiliares, promovendo depressão da proliferação e da produção de linfocinas por estas células (Godal, 1984), com consequente deficiência da resposta imunecelular e evolução da doença.

Entretanto, durante o surto de reação, os virchowianos podem apresentar, em nível celular, um mecanismo de defesa caracterizado pela ação da proteína-C-reativa, em altas concentrações séricas nos virchowianos reacionais (Tabela XI), reduzindo de até 70% a atividade dos linfócitos supressores/citotóxicos (Figura 18), sem alterar a linfoproliferação induzida pela PHA, determinando um aumento relativo da atividade das células T auxiliares e, em consequência, a melhora da resposta.

Em tuberculóides a resposta proliferativa com o mitógeno ConA tende a ser menor que em virchowianos (Figura 18) e decresce durante o surto de reação demonstrando que é menor a atividade de linfócitos estimulados pela ConA na hanseníase tuberculóide e que a reação hansênica desta forma polar da doença, tem características diferentes das do eritema nodoso da hanseníase virchowiana.

A adição de proteína-C-reativa diminui em 25% a blastogênese induzida pela ConA (Tabela XIII) em linfócitos de doentes tuberculóides, mas nos tuberculóides reacionais a resposta linfoproliferativa à ConA não foi alterada pela adição de PCR (Tabela XIV e Figura 18).

Assim, os resultados indicam que PCR é depressora de imunidade celular de linfócitos de tuberculóides, estimulados pela ConA, destacando a especificidade desta proteína para esta população de células T, sem interrelação com a reação hansênica destes doentes.

No grupo controle os resultados da linfoproliferação revelaram que linfócitos de indivíduos normais respondem mais à PHA (M=15,0) do que à ConA (M=3,0), mostrando que é maior de proporção da população de linfócitos estimulados pela PHA.

Considerando que os linfócitos estimulados pela ConA referem-se à população de células supressoras/citotóxicas (Shou, 1976; Sakane & Greene, 1977), pode-se observar que esta população foi menor em indivíduos normais, em concordância com Lanier (1991) que relata ser de aproximadamente 3:1, a proporção de células auxiliares e supressoras/citotóxicas no sangue periférico de controles. Logo, nos controles é esperada maior blastogênese sob estímulo de PHA em relação à ConA.

Associando-se proteína-C-reativa às culturas estimuladas pela ConA, observou-se que, no grupo controle, PCR reduz de 30% a linfoproliferação estimulada pela ConA. Portanto, proteína-C-reativa tem ação supressora de blastogênese ("in vitro") induzida pela ConA, sendo esta supressão específica para este mitógeno, em doentes com hanseníase e em indivíduos não afetados pela doença.

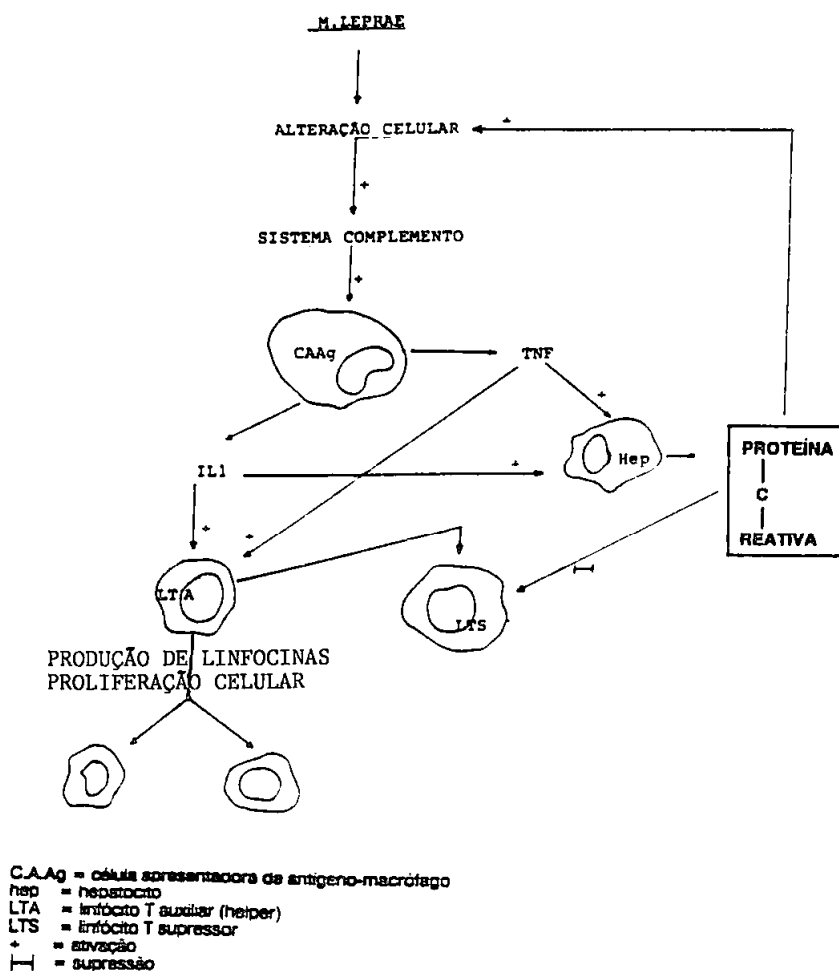
Baseando-se nos dados apresentados sobre as concentrações de proteína-C-reativa e de α TNF, bem como sobre a ação supressora de PCR sobre linfócitos T supressores em doentes com hanseníase e no grupo controle, propõe-se um mecanismo que poderia relacionar os achados e explicar alguns aspectos da reação hansênica.

Deste modo, algum fator que provocasse alteração celular, com morte de bacilos Intracelulares (tratamento, por exemplo), ativaria os mecanismos imunológicos, entre eles o sistema complemento, o qual iniciaria uma reação inflamatória aguda, com ativação de macrófagos e liberação das citocinas IL1,IL6 e α TNF (Yamada et alii, 1990). Estas citocinas estimulariam os hepatócitos induzindo-os a secretarem proteína-C-reativa.

Uma característica interessante associada à proteína-C-reativa, é que ela apresenta propriedade de lectinas, com capacidade de ligar-se a vários tipos de células e inclusive proporcionando opsonização e potenciando a ativação do sistema complemento (Yamada et alii, 1990). A ação sinérgica da PCR e do complemento resultaria em maior produção de citocinas pelos macrófagos, gerando uma reação de "feedback" positivo que alimentaria e amplificaria ainda mais a reação inflamatória, além de propiciar aumento de fagocitose e eliminação das células lesadas.

Assim, a atividade das citocinas e da proteína-C-reativa em lesões provocadas pelo *M leprae* podem proporcionar um sistema eficiente de defesa tecidual. Além disso, utilizando suas propriedades de se ligar à membrana de diversos tipos celulares, a proteína-C-reativa se ligaria especificamente em linfócitos T supressores/citotóxicos, os quais encontram-se mais reativos nos virchowianos, suprimindo a atividade destas células e proporcionando condições para que linfócitos T auxiliares possam controlar imunologicamente o processo inflamatório. Níveis elevados de α TNF e IL1 nos virchowianos reacionais, também atuariam sobre os linfócitos T auxiliares, amplificando a resposta imunológica.

A integração de todos os resultados, relacionando-os a uma reação sistêmica, na hanseníase reacional (eritema nodoso), pode ser esquematicamente representada pelo modelo:



RESUMO E CONCLUSÕES

Os níveis séricos de Proteína-C-Reativa (PCR) e o fator de necrose tumoral (α TNF) e a atividade da PCR sobre a proliferação de linfócitos de doentes de hanseníase e de indivíduos aparentemente normais (controles) foram investigados, com o objetivo de avaliar se existe correlação entre os níveis de α TNF e PCR e se é diferente a atividade da PCR sobre a blastogênese de linfócitos na presença da reação hansênica.

Foram estudados 72 indivíduos, da região de Ribeirão Preto, sendo 53 doentes de hanseníase (30 virchowianos e 23 tuberculóides) e 19 controles. Entre os virchowianos 12 apresentaram reação hansênica assim como 8 dos tuberculóides. Os controles foram subdivididos segundo o resultado da reação de Mitsuda em Mitsuda-positivos, 11 e Mitsuda-negativos, 8.

Determinaram-se as concentrações séricas de PCR em soro de doentes e controles utilizando-se o método nefelométrico. Para avaliar os níveis séricos de α TNF utilizou-se o método imunorradiométrico.

A proliferação de linfócitos foi desenvolvida em meio de cultura contendo 15% de soro AB normal, inativado pelo calor, na presença dos mitógenos fitohemaglutinina (PHA-201 $\mu\text{g/ml}$) e Concanavalina A (ConA - 10 $\mu\text{g/mL}$) e ainda de proteína-C-reativa (PCR-5,0 μml). Após separação pelo Ficoll-Hypaque, as células foram cultivadas em triplicatas e mantidas a 37°C em atmosfera contendo aproximadamente 5% de CO₂, durante 72 horas. Os resultados foram avaliados pela incorporação de 3H-timidina, fazendo-se a leitura das radiações em espectômetro de cintilação líquida.

Os resultados mostraram que as concentrações de PCR foram elevadas em virchowianos reacionais em relação ao grupo controle. Em tuberculóides (tórpidos e reacionais) os níveis de PCR são semelhantes aos dos controles.

Observou-se correlação positiva entre as concentrações de PCR e de αTNF , ou seja, os níveis de αTNF são maiores que os dos controles em doentes virchowianos reacionais, mostrando que quando a concentração de αTNF aumenta ocorre aumento da concentração de proteína-C-reativa. Outro achado interessante foi que há uma produção discreta de αTNF nos doentes (virchowianos e tuberculóides), que indica que a doença pode induzir a pequena ativação macrofágica, mas a maior ativação dos macrófagos ocorre em virchowianos reacionais.

A resposta linfoproliferativa à PHA foi menor em virchowianos que em tuberculóides e controles. Nos controles Mitsuda-negativos os índices de estimulação foram maiores. Associando-se PCR às culturas estimuladas pela PHA não se observou alteração da proliferação de doentes (virchowianos e tuberculóides), mas houve redução de 47% da resposta dos controles

Mitsuda-negativos e aumento de 53% da blastogênese dos Mitsuda-positivos.

Linfócitos de doentes e controles, cultivados na presença de PCR, não apresentaram estimulação ou depressão da resposta proliferativa.

Estes dados sugerem que a proteína-C-reativa não interfere com a resposta linfoproliferativa, induzida pela PHA, em doentes de hanseníase; entretanto no grupo controle é depressora da blastogênese dos Mitsuda-negativos e indutora da proliferação nos Mitsuda-positivos.

Sob estímulo de ConA observou-se maior proliferação em linfócitos de virchowianos, especialmente os reacionais, que nos tuberculóides e controles, indicando que na hanseníase virchowiana a população de células estimulada pela ConA (supressora/citotóxica) tem maior atividade blástica. A proteína-C-reativa reduziu de 58% a linfoproliferação Induzida pela ConA em virchowianos e de 70% nos virchowianos reacionais. Nos tuberculóides (sem relação com reação hansênica) e nos controles (Independentemente da reação de Mitsuda) a PCR foi também depressora da atividade mitogênica da ConA, porém em nível discreto (25% nos tuberculóides e 30% nos controles).

No material estudado, com os métodos utilizados as conclusões foram as seguintes:

- 1) *Concentrações séricas de proteína-C-reativa estão elevadas nos virchowianos reacionais, diretamente relacionadas n reação inflamatória aguda destes doentes (eritema nodoso).*
- 2) *Durante o eritema nodoso a resposta inflamatória de virchowianos acompanha-se de aumento acentuado da citocina α TNF, correlacionando-se*

positivamente com as concentrações de PCR.

- 3) *Linfócitos de virchowianos apresentam linfoproliferação mais acentuada ao mitógeno ConA que à PHA. A resposta blastogênica, estimulada pela ConA, é maior em doentes virchowianos do que em tuberculóides e no grupo controle.*
- 4) *Proteína-C-reativa tem ação depressora específica da linfoproliferação induzida pela ConA em culturas de doentes e controles, mais acentuada em virchowianos, especialmente nos estados reacionais*
- 5) *Proteína-C-reativa não influencia a resposta blastogênica ao mitógeno PHA em culturas de doentes de hanseníase, mas é depressora da linfoproliferação induzida pela PHA dos controles Mitsuda-negativos e estimuladora desta resposta nos Mitsuda positivos.*
- 6) *Proteína-C-reativa não é indutora ou depressora da blastogênese em culturas de linfócitos de doentes e controles.*

REFERÊNCIAS

- . BALOU, S. P.; BUNIEL, J. and MACINTYRE, S.S. - Specific binding of human c - reative protein to human monocytes in vitro. *The J. of Immunol* 142: 2078 - 2113, 1989.

- . BECHELLI, L. M. & ROTBERG, A. - Compêndio de Leprologia. Ministério da Educação e Saúde. Departamento Nacional de Saúde. Serviço Nacional de Lepra, 1951.

- . BECHELLI, L. M. & CURBAN, G. V. - LEPRA, CAPÍTULO 13, pg 132 - 163: in Compêndio de Dermatologia, 6⁴ Edição, 1988. *Atheneu Editora* (São Paulo).

- . BEIGUELMAN, B.; PINTO JR., W.; PISANI, R.C.B.; KRIEGER, H; VOZZA, J.A. and EL GRINDY, M.M. - Lymphocyte transformation and lepromatous leprosy. *Ciência e Cultura*, 27: 217-220, 1975.

- . BEUTLER, B. and CERAMI, A. - Cachectin (tumor necrosis factor) a macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. *Endocr. Rev.* 9: 57-66, 1988.

- . BJUNE, G.; BARNETSON, S.T.C.; RIDLEY, D.S. & KRONVALL, G. - Lymphocyte transformation test in leprosy: correlation of the response with inflammation of lesion. *Clin. Exp. Immunol* 25: 85-94, 1976.

- . BLOEMENA, E.; ROSS, M.T.L.; VAN HEIJST, J.L.A.M.; VASSEN, J.M.J.J. and SCHELLEKENS, P.T.A. - Whole blood lymphocyte cultures. *J. of Immunol Methods* 122: 161-167, 1989.

- . BLOOM, B. R. - Learning from leprosy. A perspective on immunology and the third world. *The J. of Immunol.* 135: 1-10, 1986.

- . BOYUM, A - Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J. Lab. Invest.* 21 (suppl.): 97-105, 1968.

- . BUCHTA, R.; FRIDKIN, M.; PONTET, M.; CONTESSI, E.; SCAGGIANTI, B. and ROMEO, D. - Modulation of neutrophil function by C-reactive protein. *Eur. J. Bloch.* 163 : 141-146, 1987.

- . BULLOCK, W. E. and FASAL, P. - Studies of immune mechanisms in leprosy III the role of cellular and humoral factors in impairment of in vivo" immune response. J. Immunol. 106: 888-889, 1971.

- . BULLOCK, W. E. - Leprosy: A model of immunological perturbation in chronic infection. The J. of Infect. Dis, 137: 341-354, 1978.

- . DINARELLO, C. A. - Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute phase response. New Engl. J. Med ,311: 1413-1418, 1984.

- . DINARELLO, C. A. - Interleukin-1 - Ann. N. Y. Acad. Sci 587: 122-132, 1990.

- . FORD, W. L. and HUNT, S. H. - The preparation and labelling of lymphocytes. Chapter 23 of Handbook of Experimental Immunology. Second Edition, Ed. D. M. Weiss, 1973.

- . FOSS, N. T.; PAGNANO, P. M. G. and BECHELLI, L. M. - Transformation lymphoblastique de lymphocytes de malades de lépre et de contacts, stimulés par la lepromine. Milieu des culture en sérum homologue. Acta Leprol. 66-67: 223-229, 1977.

- . FOSS, N. T.; PAGNANO, P. M. G.; BECHELLI, L. M. and SIMÕES, A. L. - Lymphocyte blastogenesis and lepromin reactivity in leprosy patients and their parents. Acta Leprol. 7: 119-128, 1990.

- . GAUDIE, J.; RICHARDS, C.; NORTHEMANN, W.; FEY, G. and BAUMANN, H. - IFNB2/BSF2/IL-6 is the monocyte-derived HSF that regulates receptor-specific acute phase gene regulation in hepatocytes. Ann. N. Y. Acad. Sci: 557 46-59, 1989.

- . GEWURZ, H. - Biology of C-reactive protein and the acute phase response - Hospital Practice .17: 67-81, 1982.

- . GODAL, T.; MYKLESTAD, B.; SAMUEL D. R. and MYRVANG, B. - Characterization of the cellular immune defect in lepromatous leprosy. A specific lack of circulating M. leprae reactive lymphocyte Clin. exp. Immunol. 9: 821-831, 1971.

- . GODAL, T. - Leprosy immunology - some aspects of the role of the immune system in the pathogenesis of disease. Lepr. Rev. 55: 407-414, 1984.

- . GOTSCHLICH, E. - C-reactive protein. A historical overview. Ann N.Y. Acad. Sci ,557: 9-18, 1989.

- . HANKS, J. H.; ABE, M.; NAKAYAMA, T. T.; BECHELLI, L.M. and DOMINGUEZ, V. M. - Studies towards the standardization of lepromin. Bull Wld. Hlth. Org. ,42: 703-707, 1970.

- . HAREGOWOIN, A.; GODAL, T.; MUSTAFA, A. S.; BELEHIX and YEMANEBERHAN, T. - T - cell conditioned media reverse T cell unresponsiveness in lepromatous leprosy. *Nature* 303: 342-344, 1983.
- . HEINRICH, P. C.; CASTELL, J. V. and ANDUS, T. - Interleukin-6 and acute phase response. Review Article. *Biochem J* 265: 621-636, 1990.
- . HIND, C. R. K.; WINEARLS, C. G.; PAPYS, M. B. - Correlation of disease activity in systemic vasculitis with serum C-reactive protein measurement. A prospective study of thirty-eight patients. *Eur. J. of Clin. Investig.* 15: 89-94, 1985.
- . JAMES, K.; HANSEN, B. and GEWURZ, H. - Binding of C-reactive protein to human lymphocyte. I Requirement for a binding specificity. *The J. of Immunol.* ,127: 2539-2544, 1981(a).
- . JAMES, K.; HANSEN, B. and GEWURZ, H. - Binding of C-reactive protein to human lymphocytes. II Interaction with a subset of cells learning the Fc receptor. *The J. of Immunol.* ,127: 2545-2550, 1981 (b).
- . KAPLAN. M. H. and VOLANAKIS, J. E. - Interaction of C-reactive protein complexes with complement system. I Consumption of human complement associated with the reaction of C-reactive protein with pneumococcal C-polysaccharide and with choline phosphatides, lecithin and sphingomyelin. *J. Immunol.* ,jam: 112:2135-2147. 1974.

- . KUSHNER, I.; VOLANAKIS, J. E. and GEWURZ, H. - C-reactive protein and the plasma protein response to tissue injury Ann. N. Y. Acad. Sci. 389: Eds, 1982 (a).

- . KUSHNER, I. - The phenomenon of the acute phase response. Ann, N. Y. Acad. Sci., 389 39 - 48, 1982 (b).

- . KUSHNER, I; GANAPATHY, M.; SCHULTZ, D. The acute phase response is mediated by heterogeneous mechanisms. Ann, N. Y. Acad. Sci. 557: 19-30, 1989.

- . LANIER, L. - Cells of the immune response. Lymphocytes a mononuclear phagocytes - Chapter 5, pg. 61-72, in Basic and Clinical Immunology. 7th Edition. 1991. Ed. Int. Lange Medical. (Daniel B. Stites and ABBA I TERR).

- . LANGUILLON, J. - Précis de Léprologie. édition. Editora Masson. Paris (New York, Barcelone, Mexico, Milan, São Paulo), 1986.

- . MEHRA, V. ; MASSON, L. H.; FIELDS, J. P. and BLOOM, B. R. - Lepromin induced suppressor cells in patients with leprosy. The J. of Immunol. 123: 1813-1817, 1979.

- . MEHRA, V.; MASSON, L. H.; REINHERZ, E. L.; SCHLOSSMAN, S. F. and BLOOM, B. R. - Delineation of a human T-cell subset responsible for lepromin-induced suppression in leprosy patients. *The J. of Immunol.* 125: 1183-1188, 1980.

- . MEHRA, V.; CONVIT, J.; RUBINSTEIN, A.; BLOOM, B. R. - Activated suppressor T-cells in leprosy. *The J. of Immunol.* 129: 1946-1951, 1982.

- . MENZEL, S.; BJUNE, G. and KRONWALL, G. - Lymphocyte transformation test in healthy household contacts of patients with leprosy. I. Influence of exposure to leprosy with a household. *Int. J. Lepr.* 47: 138 - 152, 1979 (a).

- . MENZEL, S.; BJUNE, G. and KRONVALL, G. - Lymphocyte transformation test in healthy household contacts of patients with leprosy. II. The influence of consanguinity with the patient, sex and age. *Int. J. Lepr.* 21: 153-160, 1979 (b).

- . MITSUDA, K. - On the value of a skin reaction to a suspension of leprosy nodules. *Int. J. Lepr.* 21: 347-358. 1953.

- . MODLIN, R. L. and REA, T. H. - Leprosy: New Insight into an ancient disease. *J. Am. Acad of Dermatol.* 17: 10-13, 1987.

- . MORTENSEN, R. F. - Inhibition of colony formation by macrophage committed stem cells during acute inflammation by purified human C-reactive protein (CRP) - Ex. Hematol. 11: 730-737, 1983.
- MULLEX, I. L. and FEHR, J. - Binding of C-reactive protein to human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for association of binding sites with Fc receptors. J. Immunol. 136: 2202-2207, 1986.
- . NELSON, D. S.; ELSON, M.; THURSTON, J. M.; WAFERS, M. F. R. and PEARSON, J. M. H. - Phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in leprosy. Min. exp. Immunol. 9: 33-43, 1971.
- . OLIVEIRA, E. B.; GOTSCHLICH, E. C. and LIU, T. V. - Primary structure of human C-reactive protein. Proceedings of the Nat. Acad. Sc. - 74: 3148, 1977.
- . OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W.; FATFYNEK, C. - Cytokines Chapter 7th, pg 78-100 in Basic and clinical Immunology. 7th Edition, 1991. Ed. Int./ Lange Medical. (Daniel B. Stites and ABBA I TERR)
- . PAGNANO, P. M. G. - Blastogênese de linfócitos de doentes de lepra, comunicantes e não comunicantes lepromino-positivos ou negativos, cultivados "in vitro" e estimulados pela fitohemaglutinina, em meio com soro heterólogo, plasma autólogo ou homólogo. Boletim da Divisão Nacional de Lepra. 33 : 5-55, 1974.

- PAGNANO, P. M. G.; BECHELLI, L. M. et LIMA, F^o, E. C. - Test de transformation de lymphocytes (11L) par la phytohemagglutinine, la lépromine et M. leprae chez des malades de lépre lepromino-négatifs, valeur pronostique comparées avec celle de la lepromina. Acta Lepr. 86-87: 83-95, 1982.
- . PEARSON, J. M. H. - Reactions in leprosy in Essentials of Leprosy. 4th Edition. Published by the German Leprosy Relief Association, 1986.
- . PEPYS, M. B.; BALTZ, M. L. - Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. Adv. Immunol. al: 34:141-212, 1983.
- . RABELLO JUNIOR, A. V. - Uma classificação clínico-epidemiológica das formas de lepra. Rev. Bras. Leprol. 4 (número especial): 375-710, 1986.
- . RAYNES, J. G.; EAGLING, S. and Mc ADAM, K. P. W. J. - Acute - phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential-regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. Clin. Exp. Immunol. 83: 488-491, 1991.
- . ROTTEVEEL, F. T. M.; KOKKELINK, I.; VAN SIER, R. A. W.; KUWNWN, B.; MEAGER, A.; MZEDEMA, F.; LUCAS, C. J. - Clonal analysis of functionally distinct human CD₄ T cell subsets. J. Exp. Med. 168 :1659-1673, 1988.

- SAKANE, T. and GREENE, I. - Human suppressor T cell induced by Concanavalin A: Suppressor T cell belong to distinctive T cell classes. *J. Immunol.* 119: 1169-1178, 1977.
- . SARNO, E. N.; GRAU, G. E.; VIEIRA, L. M.; NERY, J. A. - Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin. exp. Immunol.* 84: 103-108, 1991.
- SHOU, L.; SCHWARTZ, S. A.; GOOD, R. A. - Suppressor cell activity after Concanavalin A treatment of lymphocytes from normal blood donors. *J. Exp. Med.* 143: 1100-1110, 1976.
- . SILVA, C. L.; FOSS, N. T. - Tumor necrosis factor in leprosy patients. *Journal of Infec. Dis.* 159(4): 787-789, 1989.
- . TAYLOR, A. W.; N. O. KU; MORTENSEN, R. F. - Both human IL1. and IL6 induce synthesis of C-reactive protein (CRP) by PLC/PRF/5 hepatoma cell line. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 557: 532-533, 1989.
- . VAN SNICK, J. - Interleukin-6: An overview. *Ann. Rev. Immunol.* 8: 253-278, 1990.

- . WHISLER, R. L.; NEWHOUSE, Y. G.; MORTENSEN, R. F. - Modulation of human B lymphocyte colony formation by C-reactive protein. *J. Immunol.*, 130: 248-253, 1983.

- . WHISLER, R. L.; NEWHOUSE, Y. G.; MORTENSEN, R. F. - C-reactive protein reduces the promotion of human B-cell colony formation by autoreactive T4 cells and T cell proliferation during an autologous mixed lymphocyte reaction. *Cell Immunol.* 102, 287-298, 1986.

- . YAMADA, Y.; KIMBALL, K.; OKUSAWA, S.; VACI LINO, G.; MARGOLIS, N.; SOHN, J.; LI, J. L.; WAKABAYASHI, G.; Mc ADAM, K.; BURKE, J. F.; DINARELLO, C. A.; GELFAND, J. A. - Cytokines, acute phase proteins and tissue injury C - reactive protein opsonizes dead cells for debridement and stimulates cytokine production. *Ann N. Y. Acad. Sci.*, 587: 351-361, 1990.

- . YAP, S. H.; MOSHAGE, H. J.; HAZEMBERG, B. P. C.; ROELOFS, H. M. J.; BIZZET, J.; LIMBURG, P. C.; AORDEN, L. A. and VAN RIJWYK, M. H. - Tumor necrosis factor (TNF) inhibits interleukin-1 and/or IL-6 stimulated synthesis of C-reactive protein (CRP) and serum amyloid A (SAA) in primary cultures of human hepatocytes. *Bioch. Bioph. Acta* 1091: 405-408, 1991.

- . ZAHEDI, K. and MORTENSEN, R. F. - Macrophage tumoricidal activity induced by C-reactive protein (CRP). *Cancer Research* 46: 5077-5083, 1986.

- . ZAHEDI, K.; TEBO, J. M.; SIRIPONT, J.; KLIMO, G. K. and MORTENSEN, R. F. - Binding of human C-reactive protein to mouse macrophage is mediated by distinct receptors. *The J. of Immunol.* 142:2384-2392, 1989.

- . ZELLER, J. M.; KUBAK, B. M.; GEWURZ, H. - Binding sites for C-reactive protein on human monocytes are distinct from IgGFc receptors *Immunol.* 67: 51-55, 1989.

A N E X O I

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA MÉDICA
DISCIPLINA DE DERMATOLOGIA
PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____ Reg. HC _____
 Cor _____ Idade _____ Sexo _____ Profissão _____
 Endereço _____ No. _____ CEP _____
 Bairro _____ Cidade _____ Fone _____

2. ANTECEDENTES

História familiar (especificar as doenças)
 Tempo de diagnóstico
 Trabalhos perdidos relacionados à doença
 Número de internação relacionados
 Imobilização prolongada
 Outros antecedentes

3. EXAMES ANTERIORES

Sangue	/	/			P.C.R.	
GV			/	/	a1	Globulinas
GB					a2	Globulinas
VHS						
HB						
Biópsia local		No.		Resultado		
Baciloscopia local		M.N.		Cotovelo		Outras
Mitsuda	/	/				

4. TRATAMENTOS

Drogas

Drogas	Duração	Intercorrências
1. _____		
2. _____		
3. _____		
4. _____		

5. CONCLUSÃO

6. RESULTADOS