

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 hansenica 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 efectoras, 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:

