

5. DISCUSSÃO

Critérios clínicos e laboratoriais podem ser empregados no seguimento do tratamento de pacientes com hanseníase. Particularmente com relação aos testes sorológicos, a detecção de anticorpos específicos ao glicolípido fenólico do *M. leprae* (anti-PGL-I) tem mostrado ser um bom marcador do efeito da PQT em pacientes MB com alta carga bacilar (72, 73).

Ao monitorarmos os níveis de anticorpos anti-PGL-I, observamos que 73% dos pacientes MB apresentaram positividade antes do tratamento e que, no decorrer do seguimento, houve um significativo declínio nos níveis de anticorpos, a partir do 4º mês de tratamento, em relação ao valor detectado no momento do diagnóstico, tendo esse declínio se acentuado aos 12 meses.

Achados semelhantes aos nossos foram encontrados por Cunha⁽⁷⁴⁾, em 1998, que detectou altos níveis de anticorpos anti-PGL-I em pacientes MB no momento do diagnóstico, bem como uma redução significativa ao longo do tratamento com PQT, paralela à melhora do quadro clínico, mostrando que a eficácia terapêutica pode ser avaliada pela queda da concentração de anticorpos anti-PGL-I.

Verificamos, ainda, que enquanto a maioria dos pacientes MB apresentava elevados níveis desses anticorpos, os PB exibiam baixos níveis de anticorpos com uma positividade de 40% no momento do diagnóstico, havendo um declínio no decorrer do tratamento. Esses achados estão de acordo com os encontrados na literatura (74, 75)

Utilizando-se a técnica de ELISA, estudos demonstram que os níveis de anticorpos anti-PGL-I em pacientes MB variam entre 75% e 100% de positividade, enquanto nos PB variam entre 15 e 40% de positividade (76), semelhante aos resultados obtidos por nós.

Em nosso estudo também avaliamos os níveis séricos de anticorpos anti-PGL-I nas formas polares da hanseníase (HV e HT), bem como no grupo HD. Os resultados demonstraram que 40% dos pacientes HT, 67% dos HD e 78% dos HV apresentaram positividade no momento do

diagnóstico. Esses valores crescentes de anticorpos anti-PGL-I dentro do espectro da doença do pólo HT para o HV, têm sido observados na literatura (42,77, 78).

Vale aqui salientar o estudo de Chanteau et al., em 1988⁽⁷⁹⁾, que estudaram a utilização de três diferentes antígenos sintéticos do PGL-I para testes sorológicos, como o dissacarídeo-octil-BSA (D-O-BSA), o trissacarídeo-octil-BSA (T-O-BSA) e o trissacarídeo-fenil-BSA (T-P-BSA). Os autores demonstraram a eficiência dos testes com esses três antígenos, especialmente nos pacientes MB, parecendo o teste com o T-P-BSA ser mais específico e sensível para detectar níveis séricos de anticorpos em pacientes PB.

No presente estudo, para a realização da técnica de ELISA, empregamos o antígeno T-P-BSA, o que talvez seja o motivo de termos encontrado elevado percentual de positividade (40%) nos pacientes HT, no momento do diagnóstico.

Outra possível explicação para o fato de o grupo de pacientes HT ter positividade de 40% para anti-PGL-I, seria esses pacientes apresentarem um maior comprometimento neural. Essa provável relação foi demonstrada em estudo realizado por Roche et al., revelando que o aumento da resposta de anticorpos anti-PGL-I espelha o aumento do comprometimento de nervos e, conseqüentemente, as incapacidades físicas (80).

Durante a PQT, os resultados demonstraram que os pacientes HV e HD apresentaram uma diminuição significativa de anticorpos específicos, respectivamente, aos 12 meses e a partir do 6º mês de tratamento. Isto relaciona-se, possivelmente, com uma tendência de melhora da resposta imune celular nesses pacientes, bem como a ação da terapêutica, especialmente nos HD.

Com relação aos pacientes HT, não se observou diferença significativa nos níveis de anti-PGL-I no decorrer do tratamento, apesar de alguns deles terem apresentado resultados positivos, com níveis decrescentes de anticorpos durante a PQT. Além do nosso trabalho, outros

também relataram níveis significativamente menores de anticorpos anti-PGLI em pacientes submetidos a PQT, principalmente nos HV, em relação aos níveis detectados antes do tratamento^(75,81,82), provavelmente, em decorrência da diminuição da carga bacilar.

Apesar de constatarmos que pacientes HV e HD tratados por 12 meses apresentaram níveis inferiores aos valores detectados nas amostras no momento do diagnóstico, a eficácia do tratamento não deve ser avaliada somente pela queda destes anticorpos séricos, uma vez que os anticorpos podem permanecer na circulação durante muito tempo. Assim, a utilização de outros parâmetros poderia auxiliar no acompanhamento da terapêutica e no estabelecimento da alta clínica.

Desse modo, os achados de Douglas et al.⁽⁸³⁾ reforçam a idéia do emprego de testes sorológicos com antígenos específicos do *M. leprae*, como o PGL-I, para determinar os níveis de anticorpos específicos e do IB na avaliação da eficácia da quimioterapia nos casos de hanseníase da forma HV. Eles demonstraram que os níveis de anticorpos anti-PGL-I diminuíram ao longo do tratamento, de modo que o valor médio de declínio foi de 55% no primeiro ano, 44% no segundo, e 32% no terceiro ano, totalizando um decréscimo de 68% no período de três anos, em relação ao início da terapia. Em paralelo observaram também um declínio do IB.

No presente estudo, quando correlacionamos os níveis de anticorpos anti-PGL-I com o IB, verificamos correlação positiva ($p < 0,05$), sugerindo que o teste sorológico pode ser empregado no acompanhamento da terapêutica, especialmente em pacientes com IB acima de 2+.

Os resultados da correlação obtidos neste estudo estão de acordo com aqueles encontrados por Cho et al.⁽⁸⁴⁾, que afirmaram haver boa correlação entre IB e níveis de anti-PGL-I nos indivíduos sem tratamento e no decorrer da PQT.

Além desses marcadores laboratoriais utilizados para a monitoração terapêutica, a quantificação de neopterinina nos pacientes com hanseníase revelou que os MB produzem níveis maiores deste composto, quando

comparados aos PB. De modo semelhante, quando os pacientes foram agrupados de acordo com a forma clínica encontramos níveis maiores nos pacientes HV.

Na literatura consultada existem poucos estudos quantificando a neopterinina em pacientes com hanseníase. Schmutzhard et al.⁽⁸⁵⁾, ao avaliarem a excreção de neopterinina urinária em pacientes hansenianos, verificaram níveis elevados em 80% deles, não havendo diferença entre pacientes HT e HV.

Hamerlink et al.⁽⁵²⁾, ao acompanharem pacientes hansenianos sem reação, por um período de 18 meses de tratamento, evidenciaram poucas mudanças nos valores de neopterinina, concordando com os resultados encontrados por nós, que, ao analisarmos separadamente os MB e PB, também não obtivemos alterações significativas ao longo do tratamento. No entanto, ao compararmos os níveis deste composto entre pacientes MB e PB, obtivemos diferença significativa entre eles em todo o período de seguimento. Nossos resultados diferem daqueles obtidos por Hamerlink et al.⁽⁵²⁾, que não encontraram diferença significativa entre pacientes MB e PB.

Analisando os nossos resultados individualmente podemos observar que dos 09 pacientes HV, 05 tiveram reação tipo 2 e 02 reação tipo 1 (e portanto, deveriam ser classificados como virchovianos subpolares); dos 06 pacientes dimorfos, 04 deles tiveram reação tipo 1. Na reação tipo 2 está descrito que os pacientes exibem ativação transitória da resposta imune celular com produção de INF737>. De modo semelhante, também na reação tipo 1 existe um aumento da resposta imune celular. Sendo assim, é possível que as alterações nos pacientes MB, quanto à produção de neopterinina, sejam decorrentes do aumento da imunidade celular como conseqüência dos estados reacionais.

Nos pacientes PB (10 HT) a quantificação de neopterinina foi semelhante ao grupo controle, isto é, os níveis foram inferiores a 10 nmol/l. Embora os pacientes fossem virgem de tratamento quando foram incorporados a este estudo, é possível que eles já tivessem produzido

neopterina durante a resposta imune celular ao bacilo nas fases iniciais do processo infeccioso e, no momento, este metabólito estaria sendo produzido em quantidades mínimas. Cabe salientar que Hamerlink et al. também encontraram valores de neopterina próximo ao valor normal, nos pacientes PB avaliados ⁽⁵²⁾.

Em outras patologias, estudos têm demonstrado concentrações elevadas de neopterina em pacientes com tuberculose pulmonar^(53,86) e em indivíduos HIV soropositivos assintomáticos⁽⁷⁾. Immanuel et al.⁽⁸⁸⁾ encontraram níveis de neopterina sérica em pacientes HIV soropositivos coinfectados com tuberculose, tendo esses níveis diminuído com a terapia antituberculose, porém os valores se mantiveram positivos. Neste mesmo estudo, verificaram níveis mais elevados naqueles pacientes com linfócitos T CD4 < 200mm³, indicando progressão da doença HIV ou um prognóstico de piora. Na leishmaniose os níveis de neopterina se apresentam elevados nos pacientes com leishmaniose visceral; porém, na forma cutânea da doença, os níveis mostraram-se inferiores a 10 nmol/l, concordando com os resultados observados em nossos pacientes HT ⁽⁵⁵⁾.

O estudo da correlação entre a quantificação de neopterina e IB, no momento do diagnóstico, revelou correlação positiva entre esses parâmetros, indicando que quanto maior a carga bacilar, maior é o nível de neopterina liberada. Uma possível explicação para esse fato pode estar relacionada ao afluxo constante de monócitos/macrófagos para o foco inflamatório em pacientes MB. Sabe-se que nestes pacientes o infiltrado inflamatório é constituído por granulomas macrofágicos extensos e abarrotados de bacilos e que, mesmo com o tratamento poliquimioterápico, o antígeno bacilar permanece por muitos anos nos tecidos, o mesmo ocorrendo com os granulomas macrofágicos multivacuolados (células de Virchow)⁽⁸⁹⁾. Sendo assim, é possível que esteja havendo um influxo constante de monócitos para o foco inflamatório, os quais seriam estimulados a produzirem neopterina; ao contrário das células de Virchow que não apresentariam essa capacidade.

Alterações sorológicas inespecíficas estão bem documentadas na hanseníase, especialmente na forma HIV, como elevados níveis de imunoglobulinas, presença de auto-anticorpos e concentração de CRP aumentada. Embora possam contribuir para a avaliação da atividade da doença, é importante salientar que a análise isolada de qualquer um desses parâmetros não é suficiente para indicar ou prever sua exacerbação.

A CRP parece desempenhar importante papel biológico, pois é uma molécula conservada entre vertebrados e apresenta rápida e imediata elevação durante a reação de fase aguda⁽⁹⁰⁾. Entre as diversas funções atribuídas à CRP, talvez a mais importante seja a sua capacidade de se ligar a componentes da membrana celular (principalmente à fosfocolina)⁽⁹¹⁾, assim como à cromatina e seus fragmentos^(92.93), formando complexos que ativam a via clássica do complemento, com liberação de opsoninas e eventual fagocitose e remoção dessas estruturas da circulação⁽⁹⁴⁾. É interessante observar que a ligação da CRP às membranas celulares se dá apenas após a ruptura destas. Essa propriedade sugere importante papel da CRP na defesa inespecífica do hospedeiro, em virtude da remoção de restos celulares derivados de células necróticas ou danificadas no processo inflamatório, tanto de microorganismos como do próprio hospedeiro, permitindo assim a reparação tecidual.

Há uma grande variação individual na quantidade absoluta de CRP produzida em resposta a um estímulo específico, seja ele inflamatório, infeccioso ou traumático, de modo que uma única determinação de CRP não deveria ser interpretada isoladamente⁽⁹⁵⁾. Portanto, num dado paciente, os níveis séricos da CRP deveriam ser analisados dentro do contexto clínico e preferencialmente de forma seriada, a fim de informar com maior precisão e precocidade o grau de atividade inflamatória.

Neste estudo, ao compararmos a produção de CRP entre as formas clínicas verificamos que os pacientes HV apresentam níveis maiores desta proteína, particularmente no momento do diagnóstico, quando comparados

aos demais pacientes; por outro lado, ao avaliarmos o efeito do tratamento com PQT na concentração da CRP, nenhuma alteração foi observada.

As alterações nos níveis de CRP encontradas nos pacientes HV, podem ser devido ao fato desses pacientes exibirem processo inflamatório intenso, com elevada carga bacilar, alteração da resposta imune humoral e danos teciduais.

Nos pacientes HD e HT, encontramos níveis baixos de CRP, possivelmente em virtude da limitação do método semiquantitativo. O uso de métodos com alta sensibilidade, incluindo a metodologia quantitativa por nefelometria, permitiria a detecção de concentrações com limite inferior mais baixo⁽⁹⁶⁾.

Alguns pesquisadores não puderam detectar proteínas de fase aguda, em soro normal humano, pelos métodos de aglutinação em látex ou eletroforese em gel de agarose. No entanto, usando o método de radioimunoensaio, com limite de detecção cerca de cinquenta vezes mais baixo do que o de tais métodos, as proteínas de fase aguda puderam ser determinadas na concentração de até 3 ug/l⁽⁹⁶⁾

No decorrer do estudo, os pacientes apresentaram sinais clínicos de reações tipo 1 e tipo 2. Como estabelecemos os períodos de coleta fixos, nem sempre o momento da reação foi exatamente o da coleta. Desse modo, agrupamos os pacientes em três grupos (reação tipo 1, tipo 2 e sem reação) e analisamos os parâmetros determinados ao longo do seguimento.

Quando avaliamos os níveis de anticorpos anti-PGL-I nos estados reacionais e durante a PQT, não verificamos diferença significativa entre pacientes SR e com reação, sugerindo que a pesquisa de anticorpos não parece ser um bom parâmetro para diferenciar os pacientes reacionais dos não reacionais.

Nossos resultados mostraram-se concordantes com o estudo realizado por Stefani et al.⁽⁹⁷⁾, que avaliaram pacientes hansenianos recém- diagnosticados, com reação tipo 1 e 2, e associaram os resultados com IB. Verificaram que, independente do estado reacional, os pacientes

apresentaram altos níveis de IgM anti-PGL-I, estando o perfil desses anticorpos diretamente associado com o IB.

Nossos resultados também concordam com àqueles obtidos por Cunha em 2001, que verificou ausência de diferenças significantes nos níveis séricos de anticorpos anti-PGL-I entre os grupos de pacientes sem reação, com reações tipo 1 e tipo 2, aos 12, 24 e 36 meses de acompanhamento⁽⁹⁸⁾.

Alguns pesquisadores sugerem que, durante o surto da reação tipo 2, os pacientes HV, que apresentam perfil de resposta imune humoral (Th2), desenvolvem ativação transitória da resposta imune celular (Th1), o que pode levar à inibição da resposta Th2 e, conseqüentemente, diminuição da produção de anticorpos^(37 99). Este fato poderia justificar a não alteração nos níveis de anticorpos, durante o curso do quadro de reação tipo 2, conforme encontrado em nosso estudo.

No grupo de pacientes que apresentaram reação tipo 1, verificamos diferença significativa durante o tratamento, entre os momentos 0 e 12, apresentando diminuição com a quimioterapia. Nossos resultados estão de acordo com os achados de Roche et al.⁽¹⁰⁰⁾ que sugerem não haver envolvimento direto dos anticorpos IgM anti-PGL-I na patogênese da reação tipo 1. Os autores também mostraram que 88% dos episódios de reação tipo 1 ocorrem em pacientes não tratados ou dentro dos primeiros 6 meses de terapia, fato este ocorrido em nossa pesquisa.

Sabe-se que o PGL-I não parece ser um antígeno de células T (101), sendo a resposta imune celular direcionada, de maneira geral, aos antígenos protéicos. O seu papel na imunidade celular é o de favorecer a sobrevivência do bacilo no interior dos macrófagos e inibir a proliferação de linfócitos⁽¹⁰²⁾. Desse modo, outros antígenos liberados dos bacilos degradados devem ser o alvo da resposta imunológica durante a reação tipo 1.

Ao avaliarmos os resultados obtidos nos estados reacionais para neopterinina, encontramos níveis elevados nos pacientes com reação tipo 2, apontando assim para uma reatividade inflamatória intensa desses pacientes

com carga bacilar elevada, o que proporciona um dado valioso em relação a mudanças rápidas e agudas no curso da doença.

Nossos achados podem ser comparados aos obtidos por Hamerlink et al.⁽⁵²⁾, que, ao avaliarem a concentração sérica de neopterina em relação à ocorrência de surtos reacionais e à influência do tratamento com corticosteróides, encontraram níveis aumentados de neopterina nos estados reacionais, tanto na reação tipo 1 quanto na 2, e níveis diminuídos durante o tratamento imunossupressor.

Em 2004, Faber et al.⁽¹⁰³⁾, estudando os níveis de neopterina em soro de pacientes com reação tipo 1, durante o tratamento com esteróides, encontraram níveis elevados desse composto, que diminuía com o uso da prednisona, sugerindo que a neopterina parece ser um marcador útil para o diagnóstico e monitoramento deste tipo de reação. No entanto, nossos resultados não concordam com esses achados e mostram que altos níveis de neopterina sérica na hanseníase estão relacionados com a carga bacilar apontada pela correlação positiva entre neopterina e IB ($p < 0,05$).

Em nosso estudo, do ponto de vista clínico, a ausência de níveis elevados de neopterina, no grupo de pacientes com reação tipo 1, poderia ser em decorrência deste tipo de reação ser detectada tardiamente e, até mesmo, perdida, e isto tornar difícil obter valores elevados, uma vez que o trabalho celular já teria acontecido, pois os retornos dos pacientes foram agendados segundo protocolo preestabelecido. Contudo, quando os resultados foram analisados individualmente foi possível observar que dos 08 pacientes que tiveram reação tipo 1, 05 deles tiveram neopterina positiva em um dos momentos da coleta, o que provavelmente seria a fase inicial ou final da reação.

Na reação tipo 2 ocorre o contrário, visto que esta se desenvolve em poucas horas, podendo haver um ou mais surtos, o que a torna crônica, mantendo assim um nível mais elevado de trabalho celular e, conseqüentemente, níveis aumentados de neopterina. Os resultados de Sampaio & Sarno⁽³⁷⁾ e Nath et al.⁽⁹⁹⁾ reforçam nossos achados, pois revelam

que durante o episódio reacional do tipo 2 haveria ativação da resposta imune celular. tipo Th1.

Ao monitorarmos a concentração de CRP, no decorrer do tratamento, nos grupos reacionais, não encontramos diferenças significantes. Entretanto, quando os resultados foram analisados, comparando os grupos de pacientes, verificamos que aqueles com reação tipo 2 produziram níveis maiores de CRP que os sem reação, no momento do diagnóstico e aos 12 meses de tratamento. De modo semelhante, os com reação tipo 2 também produziram níveis mais elevados desta proteína que os pacientes com reação tipo 1 no 12 mês da avaliação, quando a ocorrência de reação tipo 1 foi menor. Em geral, neste tipo de reação não há comprometimento sistêmico e as manifestações são predominantemente localizadas.

Nossos dados estão de acordo com os resultados obtidos por Foss em 1991⁽¹⁰⁴⁾ e Foss et al. em 1993⁽⁶⁵⁾, que demonstram maiores níveis de CRP nos pacientes MB com reação tipo 2.

Cabe salientar que a CRP é capaz de se ligar a tecidos danificados *in vivo*⁽¹⁰⁵⁾ e de ativar a via clássica do sistema complemento⁽¹⁰⁶⁾. Neste caso a clivagem da CRP por enzimas proteolíticas pode liberar peptídeos com efeitos de quimiotaxia e estimuladores das funções de leucócitos polimorfonucleares⁽¹⁰⁷⁾. Muitos destes eventos estão presentes na reação tipo 2, podendo a CRP desempenhar um papel nos mecanismos fisiopatológicos desta reação.

Em resumo, a detecção sérica de anti-PGL-I, neopterin e CRP nos permite estabelecer algumas considerações sobre o papel destes mediadores no decorrer do tratamento:

- ❖ O teste anti-PGL-I pode ser empregado no acompanhamento da terapêutica de pacientes HV e HD, correlacionando os resultados com a carga bacilar. Nos pacientes PB, o teste revelou-se de pouca aplicabilidade prática; assim, o desenvolvimento de testes sorológicos

com outros antígenos do *M. leprae* poderia ser útil na avaliação desses pacientes durante o tratamento.

- ❖ A pesquisa de neopterinina não se constitui em ferramenta eficiente no seguimento da terapêutica; entretanto, proporciona uma vantajosa combinação com o IB como indicador de episódios reacionais em pacientes com IB e níveis de neopterinina elevados.
- ❖ A CRP não se mostrou eficaz no acompanhamento da POT nos pacientes MB e PB.