

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MACROFAGICA NA HANSENÍASE VIRCHOWIANA E TUBERCULÓIDE.

Norma Tiraboschi Foss*
Meire Soares de Atafde Oliveira**
Célio Lopes Silva***

RESUMO - Para avaliar as alterações imunológicas das formas polares da hanseníase investigou-se a produção de aTNF (fator de necrose tumoral) "in vivo" e "in vitro" de 31 indivíduos, sendo 11 virchowianos, 10 tuberculóides e 10 controles normais.

Células mononucleares aderentes do sangue periférico, foram cultivadas durante 24 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. TNF foi quantificado, através do método ELISA, no sobrenadante das culturas e no soro dos grupos estudados. Os resultados, em pg/ml, revelaram níveis de aTNF significativamente maiores no soro e nos sobrenadantes de culturas de tuberculóides em relação aos virchowianos e indivíduos normais, indicando a deficiência de macrófagos de virchowianos para o desencadeamento e manutenção da reação imune celular, favorecendo a disseminação da infecção.

Observou-se também, correlação negativa entre os índices baciloscópicos e os níveis de aTNF, sugerindo que quanto maior o fluxo bacilar menor será a atividade macrófaga com conseqüente supressão da resposta imune celular.

Palavras chave: macro fagos, hanseníase, fator de necrose tumoral aTNF.

1. INTRODUÇÃO

Hanseníase é doença infectocontagiosa cujas manifestações clínicas, imunológicas e evolutivas refletem a relação entre o hospedeiro e o parasita - *Mycobacterium leprae*.

Manifesta-se segundo um espectro de manifestações em cujos extremos existem as formas polares: virchowiana (HV) - polo de alta susceptibilidade ao bacilo e depressão de resposta imunológica e, forma tuberculóide (HT) - polo de resistência ao bacilo, no qual as alterações clínicas relacionam-se à exacerbação da resposta imune celular.

As alterações imunológicas presentes na doença, refletem a atividade das células

envolvidas na interação hospedeiro X parasita. Entre estas células macrófagos e linfócitos T têm sido amplamente estudados e contribuído para o entendimento da fisiopatologia da hanseníase. Macrófagos teciduais e os monócitos do sangue periférico, ao reconhecerem um organismo como estranho, iniciam a resposta imune celular liberando mediadores que facilitam as interações entre as diferentes células¹. Entre estes mediadores as citocinas TNF-a, IL1, IL6 e IL12 interagem com células T, do sangue periférico, tomando-as capazes de reconhecer

* Professora Associada e Chefe da Divisão de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica - FMRP-USP

** Pós-Graduada - Nível Doutorado

*** Professor Titular e Chefe do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da FMRP-USP.

os antígenos, apresentados pelos macrófagos, que a seguir, passam a sintetizar seus próprios mediadores^{6,7,10,11}. Após a estimulação dos linfócitos há liberação de INF- γ que atua como alimentador da ativação macrófágica. Em geral, as citocinas IL2, TNF- α , IFN- γ , IL12, são ativadoras de fagócitos, células T, células "natural killer" (NK) e células "killer" ativadas por linfócitos (LAK)¹⁴, como mostra a Figura 1.

Para que o hospedeiro apresente uma resposta efetiva, é necessário que possua características genéticas que permitam a eficácia desta resposta¹³. *M. leprae* é capaz de induzir células CD4+ restritas ao MHC-II, células CD8+ antígeno específicas restritas ao MHC-I e ainda, as células "natural killer", não específicas e não restritas ao MHC, lesando os macrófagos humanos¹².

Dentre as citocinas estudadas tem sido descrito que o fator de necrose tumoral- α (TNF α), aumenta a expressão do MHC classe I e a lise mediada pelas células T nas infecções virais e bacterianas⁴. Na infecção pelo *M. leprae* a produção de TNF- α , é um fator benéfico para os mecanismos de imunomodulação da doença". Macrófagos, na presença de interferon-gama (IFN γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), produzem radicais intermediários do metabolismo do oxigênio (ROI) e do nitrogênio (RNI) que facilitam a eliminação dos bacilos intracelulares através de um processo de oxidação dos parasitas. Em virchowianos, este mecanismo pode estar associado à produção de citocinas bloqueadoras

da atividade macrófágica (IL4, IL10), que atuam diretamente sobre as células, ou ainda, através de um mecanismo indireto, impedindo a ação dos mediadores α TNF e γ IFN que estimulam a diferenciação das células apresentadoras de antígenos.

Sendo o macrófago a célula desencadeadora da resposta imune celular e α TNF a citocina que atua na potencialização da atividade macrófágica, pretende-se observar a produção desta citocina, "in vitro" e "in vivo" (no soro), correlacionando a presença de α TNF com as formas clínicas (HV e HT) e a evolução da hanseníase.

2. GRUPO DE ESTUDO

Foram selecionados 31 (trinta e um) indivíduos, sendo 21 (vinte e um) deles doentes com hanseníase dos quais 11 (onze) eram virchowianos e 10 (dez) tuberculóides. O grupo controle foi formado por 10 (dez) indivíduos normais (Tabela 1).

Todos os pacientes foram atendidos no Ambulatório de Hanseníase da Divisão de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. O diagnóstico foi realizado com base em exame clínico, histológico e baciloscópico, obedecendo aos critérios da classificação de Ridley-Jopling. Todos os pacientes estavam inseridos no programa de multidrogaterapia preconizado pelo Ministério da Saúde.

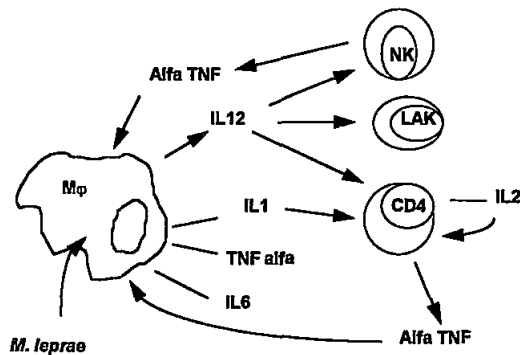


Fig. 1 - Interação entre macrófagos (M ϕ) e linfócitos (CD4, NK), através da liberação de citocinas.

Tabela 1 - Dados clínicos e laboratoriais dos grupos estudados.

Grupo	Idade anos	Sexo		Mitsuda (mn)	Tratamento		Índice Baciloscópico
		F	M		Droga	Duração	
HT n= 10	x=48.2	5	5	6.0-10.0	POT	3 m	negativo
HV n=11	x=45.9	2	9	negativos	POT	5m	x=3+
C n=10	x=26.2	5	5	3.5 - 5.0	—	—	negativo

FIT = hanseníase tuberculóide, HV = hanseníase virchowiana, C = controle, n = número de casos, PQT = poliquimioterapia, x = média

3. MÉTODOS

Linfoproliferação:

Foram isoladas células mononucleares do sangue periférico (PMBC) através do gradiente de Ficoll Hypaque. A viabilidade foi avaliada pelo Azul de Trypan e as células foram cultivadas em placas (24 wells, 1,5 ml, marca Limbro), na concentração de 3.0×10^5 células/ml. Após a aderência, durante 2 horas a 37°C /atmosf era 5% CO_2 , desprezou-se os sobrenadantes. Adicionou-se meio de cultura contendo 1,5% de soro AB humano (inativado pelo calor) às células. Fez-se culturas duplicatas; controle (sem estímulo) e na presença de LPS (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), durante 24 hs/ 37°C / 5% CO_2 . Terminado o tempo de cultura os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -70°C para a quantificação de aTNF.

Quantificação de aTNF:

Foi realizada utilizando-se o método ELISA; quantificou-se o aTNF do sobrenadante das culturas e do soro dos pacientes - Kit utilizado: Quantikine®.

Análise estatística:

Utilizou-se o método Mann Whitney.

4. RESULTADOS

Na Figura 2 observa-se que as concentrações de aTNF foram elevadas no soro de pacientes com hanseníase tuberculóide ($M = 84,5 \text{ pg}/\text{ml}$), em níveis significativamente maiores que de pacientes virchowianos ($M = 0,0 \text{ pg}/\text{ml}$; $P = 0,0001$) e de indivíduos normais ($M = 30,5 \text{ pg}/\text{ml}$; $P = 0,003$). Estes dados mostram que macrófagos de virchowianos apresentam supressão de aTNF, com conseqüente supressão da resposta imunocelular.

Quando se analisa a atividade dos macrófagos isolados, cultivados "in vitro", observa-se que na presença de LPS a produção de aTNF foi acentuadamente maior em culturas de células de tuberculóides ($M = 166,0 \text{ pg}/\text{ml}$) em relação aos macrófagos de virchowianos ($P = 13,3 \text{ pg}/\text{ml}$; $P = 0,01$). Houve portanto correlação entre os dados dos sobrenadantes das culturas e das concentrações séricas de aTNF, (coeficiente de correlação $r = 0,31$), sugerindo que a depressão imunológica é específica aos macrófagos de virchowianos, a qual poderia estar associada a menor potencialidade destas células aos mecanismos de ativação da lise bacilar.

Considerando as características clínicas dos pacientes e relacionando-as aos resultados de aTNF encontrou-se correlação negativa ($r = -0,16$) entre os índices baciloscópicos e as concentrações de aTNF sérica e dos sobrenadantes

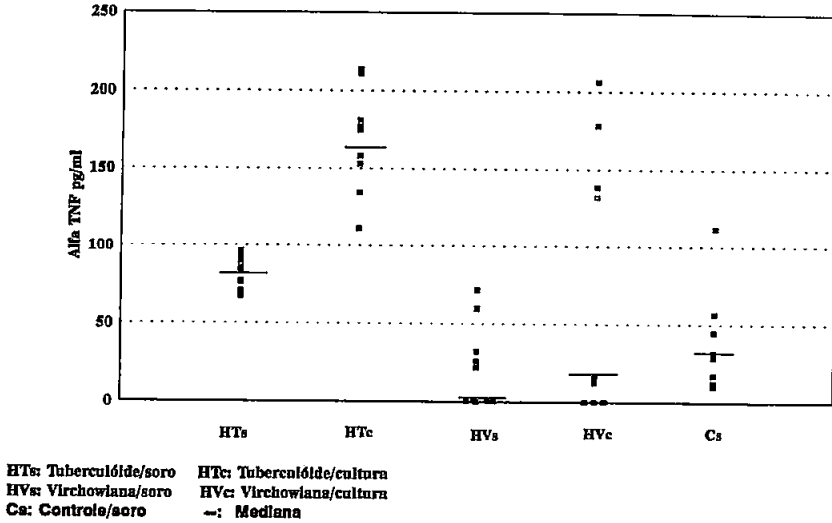


Fig. 2 - TNF (pg/ml) em soro e em sobrenadante de cultura de macrófagos em hanseníase virchowiana e tuberculóide.

das culturas, ou seja, quanto maior o índice baciloscópico, menor a produção de TNF relacionada a menor atividade macrófaga.

Assim, pode-se associar a depressão imunológica à presença do *M. leprae*, indicando que o próprio *M. leprae* poderia induzir a mecanismos supressores da atividade macrófaga, favorecendo a multiplicação de bacilos no interior das células. Por outro lado, em dois pacientes com HV não se detectou aTNF no soro (0,0 pg/ml), enquanto que nos sobrenadantes das culturas de seus macrófagos encontrou-se elevadas quantidades de aTNF (206,0 e 178,2 pg/ml). Acompanhando a evolução clínica destes pacientes foi diagnosticado, alguns dias após a coleta de sangue para o estudo, um surto de eritema nodoso. Estes achados podem indicar que a atividade celular poderia estar exacerbada, antes da manifestação clínica.

5. DISCUSSÃO

A depressão da resposta de macrófagos de virchowianos na presença do *M. leprae* tem sido amplamente estudada, utilizando diferentes metodologias de investigação. Beiguelman e Barbieri³ e Barbieri & Correa² descreveram que macrófagos de virchowianos possuem inca-

pacidade específica de digerir *M. lepras*.

Esta incapacidade específica pode estar associada à menor produção de citocinas macrófagas, como já observado pela produção de aTNF diminuída no soro de virchowianos¹⁶, e esta função pode ser recuperada durante o episódio de reação tipo entona nodoso^{8,15}.

Para explicar a importância da presença do bacilo na intensidade da resposta imune, observamos que macrófagos de indivíduos normais apresentam depressão da produção de aTNF quando exposto a PGL1¹¹, favorecendo a hipótese de que o antígeno específico do *M. lepras* PGL1, tem ação supressora na produção de aTNF.

Nesta investigação foi observado que além dos baixos níveis de aTNF no soro dos pacientes virchowianos, ocorreu correlação positiva com a produção desta citocina "in vitro", indicando que o *M. leprae* poderia atuar como potente desencadeador da produção de citocinas imunossupressoras como TGFβ1 (transforming growth factorβ1), que é produzido por macrófagos, cuja função é bloquear, especificamente, a ativação macrófaga a nível de INFγ no próprio macrófago. TGFβ1, foi encontrado, em grandes quantidades no infiltrado inflamatório de virchowianos e está ausente nas lesões de hanseníase tuberculóide⁹.

Na presença de TGF131, induzido pela *M. leprae*, macrófagos de virchowianos tornam-se deficientes na produção de aTNF na oxidação intracelular favorecendo a multiplicação do bacilo no interior do macrófago que se transforma em célula de Virchow.

Baixos níveis de aTNF ou na ausência, como detector no soro dos doentes virchowianos, revelam a deficiência de macrófagos para iniciar e manter a reação imunecelular favorecendo a disseminação da infecção. Por outro lado, na presença de aTNF desenvolve-se uma reação celular caracterizada pela ativação de linfócitos CD4+ e manutenção da estimulação macrófaga induzida por esta citocina, ocorre, portanto, uma exacerbação da resposta imunológica, como pode ser visto na hanseníase tuberculóide¹⁶⁸

Logo, aTNF é citocina fundamental para o desenvolvimento dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

Outro achado interessante é que a produção de aTNF está universalmente correlacionada ao fluxo bacilar, indicando que a presença do *M. leprae* está associada à depressão da atividade macrófaga. Com a introdução do tratamento e a

queda do número de bacilos, macrófagos tendem a recuperar sua potencialidade de resposta. Esta fato pode ser clinicamente evidenciado durante os surtos de eritema nodoso^{8'1517}, quando há aumento da produção de aTNF.

Os resultados obtidos nos sobrenadantes das culturas de macrófagos sugerem que a reação tipo eritema nodoso pode ser precedida de estimulação dos macrófagos, medida pela maior concentração de aTNF.

Considerando os resultados pode-se concluir que a depressão da resposta imunecelular na hanseníase virchowiana, está diretamente relacionada a deficiência de estimulação macrófaga e a menor produção de aTNF, favorecendo a multiplicação bacilar e a disseminação da doença e ainda que, com a redução do número de bacilos, na vigência da terapia específica, há uma tendência à recuperação da atividade dos macrófagos levando a melhora da reatividade imunológica. Portanto, o tratamento específico, deve ser instituído o mais precocemente possível para melhorar o estado imunológico do paciente com conseqüente redução do fluxo bacilar e da importância epidemiológica.

ABSTRACT - *To verify the immunologic alternations related to the polar forms of leprosy the aTNF (tumor necrosis factor), levels was determined in vivo" and in vitro" in 31 individuals: lepromatous leprosy - 1, tuberculoid leprosy - 10 and normal controls - 10.*

PBMC (peripheral blood mononuclear cells) were cultured during 24 hs/37°C/CO₂ atmosphere and aTNF levels were measured by ELISA assay, at the cultures supernatants and the serum from the three groups of individuals. The results (pg/ml) showed TNF levels significantly higher in tuberculoids patients when compared with the levels of lepromatous leprosy (LL) or controls, indicating a deficit in development and maintenance of immunecellular response, favouring the infection dissemination in LL patients.

The negative correlation between aTNF levels and baciloscopic index suggest that elevated baciloscopic levels are associated with immunecelular supression.

KEY-WORDS: *Macrophages, leprosy, tumor necrosis factor aTNF.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS AK, Lichtman AH and PoberJS: Cellular and Molecular Immunology, 2nd Edition W.B. Saunders Company, 1994.
2. Barbieri TA & Correa WM: Human macrophage culture the leprosy prognostic test (LPT) **Int. J. Lepr.** **35**: 377-380, 1967.
3. Beiguelman B & Barbieri TA: Comportamento dos macrófagos nas formas polares da lepra. **Ciência e Cult.** **17**: 304-307, 1965.
4. Champsi J, Young LS and Bermudez LE: Production of TNF α , IL6 and TGF-13, and expression of receptors for TNF α and IL6, during murine *Mycobacterium avium* infection. **Immunology** **84**: 549-554, 1995.
5. Chang J, Xing Y, Meglizzo RS and Bloom BR: Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produce by active murine macrophages. **J. Exp. Med.** **176**: 1111-1122, 1992.
6. Chonaib S, Branellec D and Burman WA: More insights into the complex physiology of TNF. **Immunol. Today** **12**: 141-142, 1991.
7. Dinarello CA and Thompson RC: Blocking of IL1: IL1 receptor antagonist "in vivo" e "in vitro". **Immunol. Today** **12** 404-410, 1991.
8. Foss NT, Oliveira EB, Silva CL: Correlation between TNF production increase of plasmaC-reactive protein level and supression of T lymphocyte response to concanavalin-A during erythema nodosum leprosum. **Mt. J. Leprosy** **61**: 218-225, 1993.
9. Goulart IMB: Detecção de TGF131 em lesões cutâneas de diferentes formas clinicas de hanseníase. **Dissertação de Mestrado** - Universidade Federal de Uberlândia: 32-38, 1995.
10. Hirano T, Akira S, Taga T and Kishimoto T: Biological and Clinical aspects of Interleukin 6. **Immunol. Today** **11**: 443-449, 1990.
11. Hsieh CS, Macatonia SE, Tripp CS, Wolf SF, Ogarro A and Murphy KM: Development of Th1 CR4+T cells through IL12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Sciences** **260**: 547-549, 1993.
12. Kalaeb B, Kiessling R, Van Embden JDA, TholeJER, Kumararatne S, Pisa P, Wondimu A, Ottenhoff THM: Induction of antigen- specific CD4+ HLA-DR restricted cytotoxic T lymphocytes as well as nonspecific nonrestricted killer cells by the recombinant mycobacterial 65 Kda heat shock protein. **Eur. J. Immunol.** **20**: 369-377, 1990.
13. Modlin RL, Kato H, Mehra V, Nelson EE, Xuedong F, Rea TH, Pattengalle PK and Bloom BR: Genetically restricted suppressor T-cell clones derived from lepromatous leprosy lesions. **Nature** **322** 459-461, 1986.
14. Ottenhoff THM: Immunology of leprosy: lesions from and for leprosy.
15. Sarno EN, Grau GE, Vieira LM, Nery JA: Serum levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 beta during leprosy reactional states. **Clin. Exp. Immunol.** **84**: 103-108, 1991.
16. Silva CL, Foss NT: Tumor necrosis factor in leprosy patients. **J. of infect Dis.** **159**:787-790, 1989.
17. Silva CL, Faccioli LH, Foss NT: Supression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolipid-1 of *Mycobacterium leprae* **61**: 107-108, 1993.