

ERITEMA NODOSO HANSÊNICO: ANÁLISE COMPARATIVA DO QUADRO HISTOPATOLÓGICO PELAS TÉCNICAS DE ROTINA E IMUNOFLUORESCÊNCIA.

Maria Esther S. Nogueira*
Raul Negrão Fleury**
Maria Sueli P. Arruda***

RESUMO - Com a finalidade de investigar a participação dos imunocomplexos (Ic) na reação de Eritema Nodoso Hansênico (ENH), fragmentos teciduais de 22 pacientes hansenianos reacionais foram avaliados através da técnica de imunofluorescência direta (IFD) em associação com técnicas histopatológicas de rotina. Os resultados demonstraram a presença de Ic em vasos e zona de membrana basal da junção dermo-epidérmica (ZMB). A presença de Ic em vasos do derma profundo e tecido celular subcutâneo em correspondência com alterações vistas sob a forma de vasculites alterativas, exsudativas e necrotizantes sugerem envolvimento destes complexos no ENH.

Palavras-chave: eritema nodoso hansênico, hanseníase, imunocomplexos, imunofluorescência, vasculite.

1. INTRODUÇÃO

O ENH é um episódio reacional verificado em pacientes hansenianos multibacilíferos, que pode manifestar-se mesmo na ausência de tratamento específico OPRMOLLA & FLEURY¹⁶. Histopatologicamente caracteriza-se por focos de inflamação aguda instalados ao longo de granulomas virchovianos regressivos com comprometimento inflamatório intenso de vasos do derma profundo e tecido celular subcutâneo BASTAZINI².

Estudos iniciais sobre o ENH, sugeriram que os mecanismos envolvidos na sua patogênese seriam semelhantes aos da reação descrita por ARTHUS¹ em 1903. Neste tipo de reação imunoglobulinas (Ig) formam complexos com antígenos (Ag), se depositam em determinados locais do organismo e geram uma série

de eventos que resultam na lesão tecidual. Embora alguns trabalhos^{9 12 13 17 20 22 23} conseguiram demonstrar depósitos de Ig e frações de complemento nas lesões de ENH, não existe uniformidade nos resultados obtidos pelos que investigam esta área.

WEMAMBU et al.²³ avaliando a presença de Ig e frações do sistema complemento em fragmentos teciduais de ENH demonstraram depósitos fluorescentes de IgG e complemento localizados perivascularmente em áreas infiltradas por polimorfonucleares. De acordo com os autores, estes resultados foram compatíveis com a hipótese do ENH estar vinculado a mecanismos semelhantes àqueles verificados experimentalmente por ARTHUS¹.

RIDLEY & RIDLEY²⁰, através da imunoperoxidase, pesquisaram a presença de Ag bacterianos e vários fatores imunológicos em

*Pesquisadora, Chefe da Equipe Técnica de Imunologia, Instituto Lauro de Souza Uma, Bauru, SP.

**Patologista, Diretor de Serviço de Epidemiologia, Instituto Lauro de Souza Uma, Baum, SP.

***Professora, Faculdade de Ciências, UNESP, campus Bauru, SP.

pacientes com ENH. Verificaram que, no centro da lesão existia desintegração de macrófagos e liberação de Ag bacterianos que se combinavam inicialmente com a Igm, posteriormente, com IgG e estavam associados aos componentes C1q, C3c, C3d e C4 do sistema complemento. Os complexos foram observados tanto extra como intracelularmente em neutrófilos e macrófagos formando um quadro constante das lesões em estágio agudo. Para estes autores, os resultados sugeriram ser o ENH um fenômeno ocasionado por Ic, que ocorreria no local da ruptura de pequenos granulomas virchovianos. Sugeriram também, que os complexos seriam extravasculares, de modo que a patogênese do ENH diferiria do clássico fenômeno descrito por ARTHUS¹.

Como não existem verdadeiras vasculites leucocitoclásticas no quadro histopatológico do ENH e, por ter sido demonstrado formação extravascular de Ic, no presente estudo reavaliou-se a reação de ENH, correlacionando o quadro histopatológico e presença de Ic detectáveis pela técnica de I FD no sentido de se conseguir dados mais esclarecedores sobre a patogênese deste quadro reacional.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A seleção e amostragem esteve na dependência do desencadeamento dos surtos reacionais tipo eritema nodoso em pacientes internados no Instituto Lauro de Souza Lima de Bauru, São Paulo, Brasil. Os pacientes foram selecionados pelo corpo clínico do Instituto e, classificados de acordo com os critérios propostos no CONGRESSO DE MADRI⁵. Ao serem incorporados ao estudo, foram esclarecidos sobre os propósitos dos procedimentos adotados, os quais só foram realizados com plena concordância dos mesmos. Dos 22 indivíduos que integraram a experimentação, 20 eram virchovianos e 2 dimorfos. Como controle foram incluídos neste trabalho 13 virchovianos não reacionais. Na época da experimentação, todos os pacientes se encontravam sob tratamento quimioterápico convencional para hanseníase.

As manifestações inflamatórias cutâneas

identificadas como próprias do ENH, foram biopsiadas como também áreas livres de reação. Os locais selecionados para estudo foram biopsiados com punch de 5mm de diâmetro e divididos em 2 partes, sendo que um dos fragmentos teciduais foi fixado em formol a 10% e processado como usual para inclusão em parafina e microtomia. As secções foram coradas pela hematoxilina-eosina¹¹ e FARACOB-FITE⁷.

O outrofragmento foi lavado com solução salina 0,85% e embebido em O.C.T. (Optimal Cutting Temperature Medium; Tissue Tek. Miles Scientific - USA), congelado em nitrogênio líquido e, processado para imunofluorescência, utilizando-se a técnica descrita por GOLDMAN⁸. Os blocos foram cortados em criostato à -20°C com espessura de 5 micras, colocados sobre lâmina de vidro e secas à temperatura ambiente por 15 minutos. As secções foram delimitadas com esmalte e, incubadas por 30 minutos à 37°C com os seguintes imunoreagentes:

<i>anticorpo anti Ig Total humano</i>	<i>(diluição 1/60)</i>
<i>anticorpo anti IgG humano</i>	<i>(diluição 1/60)</i>
<i>anticorpo anti IgM humano</i>	<i>(diluição 1/10)</i>
<i>anticorpo anti C3c humano</i>	<i>(diluição 1/10)</i>
<i>anticorpo anti Clq humano</i>	<i>(diluição 1/10)</i>
<i>anticorpo anti cadeia kappa humano</i>	<i>(diluição 1/10)</i>
<i>anticorpo anti cadeia lambda humano</i>	<i>(diluição 1/10)</i>
<i>anticorpo anti fibrinogênio humano</i>	<i>(diluição 1/10)</i>

Após período de incubação as lâminas foram lavadas em solução salinatamponada (SST) pH 7,2 por 10 minutos. Secaram ao ar frio e foram montadas em glicerina tamponada pH 9.5. A identificação dos depósitos fluorescentes foi realizada em microscópio de fluorescência ZEISS, modelo STANDART, com epi-condensador de fluorescência IV F.L objetiva 40X.

3. RESULTADOS

Histopatológicos: Os resultados obtidos estão sumarizados nas tabelas 1, 2 e 3. Por estes dados pode-se observar na tabela 1 que, as alterações epidérmicas foram raras ocorrendo apenas uma discreta hiperplasia em 36% dos casos.

NOGUEIRA, M.E.S. Eritema nodoso hansênico: análise comparativa do quadro histopatológico pelas técnicas de rotina e imunofluorescência.

Tabela 1 - Avaliação das alterações epidérmicas obtidas de áreas reacionais e não reacionais em pacientes hansenianos.

leitura histológica	área reacional	área não reacional
exocitose	4%	0%
espongiose	24%	0%
degeneração vacuolar da camada basal	4%	0%
espessamento da membrana basal	0%	0%
figuras de contração de queratinócitos	8%	0%
necrose	focal	0%
	segmentar	0%
	total	12%
hiperplasia	36%	11%
hiperqueratose	4%	0%
paraqueratose	8%	11%

Do ponto de vista da lesão específica, como observado na tabela 2, o infiltrado virchoviano era focal, distribuído em todos os níveis do derma e tecido celular subcutâneo. A avaliação baciloscóptica juntamente com a morfológica, demonstravam em geral, infiltrado

em regressão.

As alterações inflamatórias agudas mostravam predominância de dilatação e congestão vascular, tumefação endotelial e, exsudação neutrofílica. Em menor frequência ocorria edema intersticial e deposição de fibrina.

Tabela 2 - Avaliação do infiltrado específico obtidos de áreas reacionais e não reacionais em pacientes hansenianos.

leitura histológica	área reacional	área não reacional
localização	superficial	100%
	médio	100%
	profundo	96%
extensão	subcutâneo	88%
	focal	100%
estádio evolutivo	confluyente	89%
	ativo em progressão	36%
	regressivo	8%
	residual	0%
baciloscopia	infiltrado	84%
	ramos nervosos	4%
positiva	endotélio vascular	22%
		88%
		89%
		48%
		66%
		32%
		33%

Tabela 4 - Localização dos depósitos em estruturas cutâneas de áreas reacionais e não reacionais.

nº caso	zmb	zmb e vaso
3	+	-
4	+	+
7	+	+
8	+	-
11	+	-
13	+	+
14	+	+
15	+	+
16	+	+
17	-	-
18	+	+
20	+	+
22	+	+

Abreviatura utilizada

zmb: zona de membrana basal da junção dermo-epidérmica.

+ : presença de depósito fluorescente. - :

ausência de depósito fluorescente.

4. DISCUSSÃO

Analisando as características histopatológicas do ENH verificamos que correspondem às descrições da maioria dos autores^{2,4,10,13,15,19} representando reação inflamatória aguda ou sub-aguda, com graus variados de intensidade, assentados sobre infiltrados virchowianos.

O estudo histopatológico não demonstrou alterações próprias das vasculites agudas de pequenos vasos superficiais, as chamadas vasculites alérgicas e, que são relacionadas à deposição de Ig⁹. A participação dos pequenos vasos na reação foi representada por dilatação vascular, tumefação endotelial e exsudação neutrofilica. Em capilares e vênulas em nível de focos exsudativos mais densos, observamos deposição de fibrina na parede ou luz vascular e, raramente extravasamento de hemácias (Fig. 1). Estas alterações poderiam sugerir vasculites, no entanto, trombose de vasos em áreas de maior exsudação neutrofilica é frequente em vasos

mais centrais do processo inflamatório agudo, onde o aumento de viscosidade sanguínea associado à alterações endoteliais cria condições para formação de trombose. O extravasamento de hemácias pode também fazer parte da reação inflamatória aguda correspondendo a grau extremo de permeabilidade vascular.

Assim, concordamos com RATH DE SOUZA¹⁸, REA¹⁹ e WADE²¹ quando referem que as alterações observadas em capilares e vênulas não definem vasculites, mas sim, a participação própria destes segmentos da circulação sanguínea no processo inflamatório agudo. Por outro lado, as alterações observadas nas pequenas veias e artérias do plexo dérmico profundo e tecido celular subcutâneo podem ser rotuladas de vasculites, uma vez que não participam dos fenômenos exsudativos da inflamação aguda e a presença de reatividade endotelial, edema, exsudação sero-fibrinoneutrofilica com dissociação da parede muscular e, espessamento sub-endotelial, caracterizam uma inflamação de parede vascular (Fig. 2).

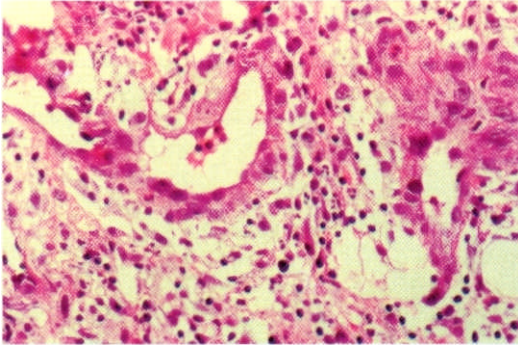


Fig. 1 - Eritema nodoso hansênico. HE. Vaso do derma médio. Dilatação vascular e intensa tumefação endotelial. Aumento original 100x.

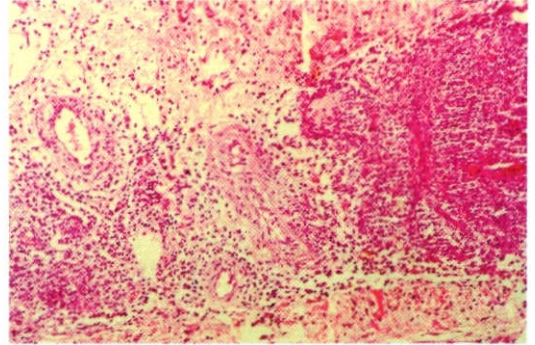


Fig. 2 - Eritema nodoso hansênico. HE Vasos do derma profundo adjacentes a áreas com intensa exsudação neutrofílica. Edema, dissociação e penetração de células inflamatórias na parede vascular. Aumento original 40x.

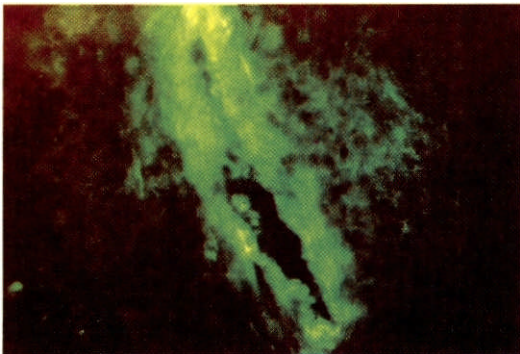


Fig. 3 - Eritema nodoso hansênico, Imunofluorescência Direta.

Depósitos da fração C3c do complemento em vaso de grande calibre do derma profundo. Aumento original 40x.

Analisando os achados imunohistoquímicos, verificamos depósitos fluorescentes localizados em vasos e ZMB da junção dermo epidérmica. Depósitos fluorescentes das frações C1q e C3c do complemento na ZMB foram observados em lesões reacionais e não reacionais. Observações semelhantes foram feitas por QUISMORIO et al.¹⁷, onde a localização e a aparência granular dos depósitos fluorescentes sugeriram aos autores que as Ig envolvidas poderiam ser auto anticorpos dirigidos contra

antígenos cutâneos. Para BULLOCK et al.³, a presença de depósitos fluorescentes de IgM na ZMB em pacientes virchovianos seriam resultantes da reatividade cruzada entre antígenos do **Mycobacterium leprae** e componentes da membrana basal da epiderme. Nos estudos de NAAFS et al.¹⁴ empregando anticorpos dirigidos contra o bacilo, relataram que alguns destes reagiam com epítopos presentes em células basais, parede arteriolar, substâncias intercelulares, extrato córneo e axônios de nervos periféricos da pele humana normal.

Em pequenos vasos do derma, observamos que os depósitos fluorescentes ocorreram principalmente junto a membrana basal e, não correspondiam a presença de vasculites nesta localização. A maioria das reações mostravam grau moderado a intenso, sugerindo correlação positiva entre intensidade da reação e presença destes depósitos. Em três fragmentos estes depósitos coincidiam com presença de bacilos no endotélio vascular. Esta associação favorece o papel dos Ig no desenvolvimento da reação inflamatória aguda sem caracterizar uma vasculite. É possível que depósitos de Ig na parede de pequenos vasos representem estímulo à reação inflamatória, propiciando dilatação vascular, aumento da permeabilidade e exsudação de plasma e elementos figurados, sem caracterizar vasculite. Assim, esta seria quase que uma reação

"fisiológica" aos I_c depositados naqueles locais, enquanto, as vasculites representariam exacerbação destes processos.

Em relação aos depósitos de frações do complemento em vasos mais calibrosos e profundos do derma e tecido celular subcutâneo (Fig. 3) notou-se em 6 casos relação entre depósitos e presença de vasculites necrotizantes; em 3 detectou-se bacilos na parede vascular ou endotélio. Esta relação condiz com a colocação de RATH DE SOUZA¹⁸ de que o envolvimento inflamatório de vasos mais calibrosos está na dependência de infiltração específica prévia da parede vascular. É possível que o Ag na parede vascular provoque a formação de I_c a este nível, estimulando o afluxo de elementos exsudativos a partir de capilares e vênulas situados em sua periferia.

Os achados histopatológicos demonstrando que as reações exsudativas são mais intensas em localização extravascular e, que vasos da

circulação terminal apresentam alterações compatíveis com sua participação na reação aguda, apóiam a idéia de que os I_c se formariam, também, em localização extravascular²⁰. Esta interpretação seria comprovada pela imunofluorescência se encontrássemos depósitos fluorescentes extravasculares e na parede de vasos mais calibrosos. Em nosso estudo os depósitos foram encontrados com grande freqüência associados a alterações inflamatórias e não conseguimos detecta-los em localização extravascular.

Contudo, é possível, que à semelhança do observado nas vasculites alérgicas o afluxo neutrofflico tenha provocado a digestão da maior parte dos I_c ou ainda, que seus elementos tenham passivamente se deslocado até serem retidos na ZMB. Os I_c permaneceriam na parede de vasos mais calibrosos porque nestes as estruturas são mais complexas que o meio extravascular do restante do derma.

ABSTRACT- To investigate the role of immunocomplexes (I_c) in type 2 reaction (ENL), tissue fragments of 22 reactional leprosy patients were studied by means of direct immunofluorescence technique (DIF) in association to routine histopathology. Results showed immunocomplexes in vessel and in the membrane of the dermal-epidermal junction (BMZ). The presence of I_c in the deep dermal vessels and in subcutaneous tissue in connection to necrotizing vasculitis alteration suggest the participation of these complexes in type 2 reaction (ENL)

Key-words: Erythema nodosum leprosum, Leprosy, Immunocomplex, Immunofluorescence, Vasculitis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARTHUS, M. Injections répétées de serum de cheval chez la lapin. *Compt. rend. soc. Biol.*, vol. 55, p. 817, 1903.
2. BASTAZINI, I. **Contribuição ao estudo da reação hansênica.** Botucatu, 1973. Tese - Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu, UNESP.
3. BULLOCK, W.E.; CALLERME, M.L.; PANNER, B.J. Immunohistologic alteration of skin and ultrastructural changes of glomerular basement membranes in leprosy. *Am. j. trop. med. Hyg.*, v. 23, p. 81-6. 1974.
4. CASTRO, A.M. Contribuição ao estudo clínico da reação leprótica. *Rev. bras. Leprol.*, v. 11, p. 23-54, 1953.
- 5 - CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 6. Madrid, Asociacion Internacional de la lepra, 1953.
- 6 - FARACO, J. Bacillos de Hansen e cortes de parafina: método complementar para pesquisa de bacillos de Hansen em cortes

NOGUEIRA, M.E.S. Entorna nodoso hansênico: análise comparativa do quadro histopatológico pelas técnicas de rotina e imunofluorescência.

- de material incluído em parafina. **Rev. bras. LeprL**, v. 6, p. 177-80, 1938.
7. FITE, G.L. Staining of acid-fast bacilli in paraf in sections. **Am. j. Path.**, v. 14, p. 491-507, 1938.
 8. GOLDMAN, M. **Fluorescent antibody methods**. New York, Academic Press, 1968, 103 p.
 9. GOWER, R.G.; MITCHEL, S.; THORNE, E.G.; KOHLER, P.F.; CLAMAN, H.N. Leucocytoclastic vasculities: sequential appearance of immunoreactants and cellular changes in serial biopsies. **J. inv. Derm.**, vol. 69, p. 477-84, 1977.
 10. HASTINGS, R.C. **Leprosy**. Edinburgh, Churchill Livingstone, 1985. 331 p.
 11. LILLIE, R.D. **Histopathologic technic and practical histochemistry**, 2^o ed. New York, Blakinston, 1954, p. 114-5.
 12. LONDONO, F.; PATARROYO, M.E.; RUEDA, M.M.D.; MEN ESES, A. Erythema nodosum leprosum. **Arch. dermat.**, v. 113, p. 234-5, 1977.
 13. MALABAY, M.C.; HELWIG, E.B.; TOLENTINO, J.G.; BINFRD, C.H. The histopathology and histochemistry of erythema nodosum leprosum. **Int. j. Leprosy**, vol. 33, p. 28-49, 1965.
 14. NAAFS, B.; KOLK, A.H.J.; LIEN, R.A.M.; FABER, W.R.; VAN DIJK, G.; VAN JOOST, T. Mycobacterium Leprae monoclonal antibodies cross-react with skin: An alternative response in leprosy. **J. inv. Derm.**, vol. 94, p. 685-88, 1990.
 15. NAAFS, B. Leprosy reactions. **Trop. geogr. Medicine**, vol. 46, p. 80-4, 1994.
 16. OPROMOLLA, D.V.A. & FLEURY, R.N. **Noções de hansenologia**. In: Centro de Estudos "Dr. Reynaldo Quagliato". Baum: Instituto Lauro de Souza Lima, 1980, 84-96.
 17. QUISMORIO, F.P.; REA, T.; LEVAN, N.; FRIOU, G. Immunoglobulin deposits in lepromatous leprosy. **Arch. dermat.**, vol. 111, p. 331-34, 1975.
 18. RATH DE SOUZA, P. Estrutura histológica; outros dados laboratoriais; bacterioscopia. **Bal. Serv. Nac. Lepra**, vol. 15, p. 26-9, 1956. (n^o especial).
 19. REA, T.H. & LEVAN, N.E. Erythema nodosum leprosum in a General Hospital. **Arch. Derm.**, vol. 111, p. 575-80, 1975.
 20. RIDLEY, M.J. & RIDLEY, D.S. The immunopathology of erythema nodosum leprosum: the role of extravascular complexes. **Leprosy Rev.**, vol. 54, p. 95107, 1983.
 21. WADE, H.W. The nature of erythema nodosum type of reaction lesion in lepromatous leprosy, with special reference to affects of repetead reactions. In: Congress International of Leprosy., 6. Madrid. 1953, **Memória**. Madrid. Madrid, 1953, p. 725-9.
 22. WATERS, M.F.R.; TURK, J.L.; WEMAMBU, S.N.C. Mechanisms of reaction in leprosy. **Int. j. Leprosy**, vol. 39, p. 417-28, 1971.
 23. WEMAMBU, S.N.C.; TURK, J.L.; WATERS, M. F.R.; REES, R.J.W. Erythema nodosum leprosum: clinical manifestation of the Arthus phenomenon. **Lancet**, vol.2, p.933-5, 1969.