

Avaliação da expressão de interleucina 1 beta (IL-1 β) e antagonista do receptor de interleucina 1 (IL-1Ra) em pacientes com hanseníase

Evaluation of the expression of interleukin 1 beta (IL-1 β) and interleukin 1 receptor antagonist (IL-1Ra) in leprosy patients

Rosane Dias Costa¹, Vanessa Amaral Mendonça², Sandra Lyon³,
Rachel Adriana Penido⁴, Ana Maria Duarte Dias Costa⁵, Marina Dias Costa¹,
Marina Pires Nishi⁶, Mauro Martins Teixeira⁷, Antônio Lúcio Teixeira⁶
e Carlos Maurício de Figueiredo Antunes⁷

RESUMO

A hanseníase é uma doença infectocontagiosa espectral que acompanha-se por uma série de eventos imunológicos desencadeados pela resposta do hospedeiro frente ao agente etiológico, o *Mycobacterium leprae*. Evidências sugerem que a indução e manutenção da resposta imune/inflamatória na hanseníase estão vinculadas a interações de múltiplas células e fatores solúveis, particularmente através da ação de citocinas. Nesse estudo, foram mensurados níveis de IL-1 β e IL-1Ra de 37 casos novos de hanseníase acompanhados ao longo do tratamento e 30 controles sadios pelo teste ELISA. A coleta de sangue periférico foi realizada em quatro tempos para os casos de hanseníase (pré-tratamento com PQT, 2^a dose, 6^a dose e pós-PQT) e em único momento para os controles. Na comparação dos níveis das moléculas de casos no pré-PQT e controles, houve diferença estatisticamente significativa somente para IL-1 β . Nossos resultados sugerem a participação dessa citocina no processo imune/inflamatório.

Palavras-chaves: Hanseníase. Interleucinas. IL-1 β e IL-1Ra.

ABSTRACT

Leprosy is an infectious and contagious spectral disease accompanied by a series of immunological events triggered by the host's response to the etiologic agent, *Mycobacterium leprae*. Evidence suggests that the induction and maintenance of the immune/inflammatory response in leprosy are linked to multiple cell interactions and soluble factors, mainly through the action of cytokines. The ELISA test was used to measure the levels of IL-1 β and IL-1Ra in 37 new leprosy patients followed-up during treatment and 30 healthy controls. Peripheral blood was collected four times during the treatment of leprosy patients (MDT pretreatment, 2nd dose, 6th dose and post-MDT), and only once from the controls. The comparison of molecular levels in pre-MDT patients and controls showed a statistically significant difference for IL-1 β . The results suggest the participation of this cytokine in the genesis of the immune/inflammatory process.

Key-words: Leprosy. Interleukins. IL-1 β and IL-1Ra.

A hanseníase é uma doença infectoparasitária crônica causada pelo *Mycobacterium leprae*, bacilo álcool-ácido resistente atóxico, intracelular obrigatório, que induz uma extraordinária resposta imune celular nos indivíduos acometidos e que afeta principalmente a pele e ramos nervosos periféricos^{4 17 19 20}. O dano neural, reconhecido por muitos autores como a complicação mais séria da hanseníase, é iniciado pela infecção e acompanhado por uma série de eventos imunológicos, cuja evolução e seqüelas

frequentemente se estendem por muitos anos após a cura do processo infeccioso^{22 28}. A doença apresenta uma particularidade importante para os clínicos e imunologistas, pois a diversidade de resposta do hospedeiro ao agente etiológico impõe um desafio diagnóstico e um modelo exemplar para o entendimento da imunidade celular no ser humano²³.

A hanseníase caracteriza-se pela alta infectividade e baixa patogenicidade, sendo que, na população, mais de 95% dos indivíduos são naturalmente imunes à infecção^{18 31 32 33}, situação que pode ser alterada em função da relação entre agente, meio ambiente e hospedeiro¹⁰. Trata-se de uma doença de apresentação espectral caracterizada por formas clínicas contrastantes, sendo que o destino da infecção parece depender da subpopulação de linfócitos T predominante, da ativação macrófágica e de quando e como uma determinada citocina está disponível no sítio da presença do parasita^{9 21 24 26}. Nas lesões tuberculóides, há predomínio de resposta Th1 e de citocinas do tipo 1, tais como interleucina (IL) 1 beta (IL-1 β) e fator de necrose tumoral alfa

1. Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brasil.

2. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG, Brasil.

3. Hospital Eduardo de Menezes, Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 4. Instituto Superior de Educação Anísio Teixeira, Fundação Helena Antipoff, Ibirité, MG, Brasil. 5. Universidade José do Rosário Vellano, UNIFENAS, Alfenas, MG, Brasil. 6. Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. 7. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

Endereço para correspondência: Dra. Rosane Dias Costa. Rua Costa Rica 90/301, Sion, 30320-030 Belo Horizonte, MG, Brasil.

e-mail: costa.rosane@uol.com.br

(TNF- α), entre outras^{13,29}. Essas moléculas estão entre as mais estudadas citocinas e evidências indicam que ambas podem agir sinergicamente impedindo a proliferação bacilar, mas também podem se tornar lesivas ao organismo, causando lesões cutâneas e neurais, na ausência de fatores regulatórios^{2,5,7,8,25}. Assim, a redução na síntese ou bloqueio dos efeitos de uma superprodução dessas citocinas, em particular, pode oferecer uma opção no controle de algumas desordens inflamatórias¹¹. IL-1 β , por exemplo, é uma das formas moleculares de IL-1, produzida por praticamente todos os tipos celulares nucleados, principalmente monócitos, macrófagos e células dendríticas e está entre os mais importantes marcadores de indução da resposta inflamatória⁶. O mecanismo de inibição natural dessa citocina envolve o bloqueio da ligação no receptor por antagonistas de receptores de citocinas, assim como o IL-1Ra, antagonista do receptor de IL-1. IL-1Ra é uma proteína da família das interleucinas originalmente descrita como uma molécula secretada por monócitos e macrófagos, que modula uma variedade de respostas imunes e inflamatórias relacionadas à IL-1³.

Nas lesões virchowianas, por outro lado, ocorre predomínio de resposta Th2 e de citocinas do tipo 2, assim como IL-4, IL-5 e IL-10. As formas dimorfas, por sua vez, representam um padrão clínico e imunológico de resposta intermediária, sendo que as citocinas expressadas tanto *in vitro* quanto *in vivo* podem não estar relacionadas a nenhum padrão já descrito^{2,5,7,8,25}.

Apesar dos progressos científicos na hanseníase, muitos questionamentos ainda persistem nos aspectos referentes à imunologia¹⁴ e é importante ressaltar que a indução e manutenção da resposta imune/inflamatória estão vinculadas a interações de múltiplas células e fatores solúveis, particularmente através da ação de citocinas. No entanto, a ativação de linfócitos T e a produção de citocinas não podem ser avaliadas de forma isolada durante a infecção²³. Assim, o estudo dos processos imunológicos é fundamental para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento e manutenção da moléstia⁹.

O presente estudo se propõe a estudar a expressão da citocina inflamatória IL-1 β e da molécula antiinflamatória IL-1Ra em pacientes com hanseníase, atendidos em Centro de Referência em Dermatologia Sanitária situado no município de Belo Horizonte.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo exploratório, descritivo, longitudinal e analítico incluindo 37 casos novos de hanseníase acompanhados ao longo da poliquimioterapia (PQT) e 30 indivíduos não infectados de área endêmica considerados controles sadios, realizado de maio de 2006 a dezembro de 2007 no Ambulatório de Dermatologia do Centro de Referência em Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes da Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais (FHEMIG), Belo Horizonte.

A coleta dos dados foi iniciada após a aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Eduardo de Menezes e da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte. A todos os

participantes da pesquisa foi solicitada a concordância por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Para o levantamento das variáveis sexo, idade, número de lesões cutâneas e de nervos acometidos, baciloscopia, teste sorológico ML Flow, classificação de Madrid e classificação operacional foram utilizados os prontuários dos pacientes. Para a mensuração dos níveis de IL-1 β e IL-1Ra através da técnica do ELISA sanduíche, os sujeitos da pesquisa foram submetidos à coletas de sangue periférico (mais especificamente plasma), realizadas em quatro tempos para os casos de hanseníase (pré-tratamento com PQT, 2ª dose, 6ª dose e pós-PQT) e em um único momento para os controles sadios. No entanto, o número de pacientes submetidos à coleta de sangue periférico na 2ª e na 6ª dose foi inferior ao do de pacientes no pré e pós-tratamento, de 15 e 19 pacientes, respectivamente. Após, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Imunofarmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, onde foram realizados os experimentos, segundo protocolo padronizado. Os níveis das moléculas estudadas foram expressos em pg/ml.

Para a análise dos dados, foram utilizadas medidas de tendência central e variabilidade, bem como o teste de Mann-Whitney para comparação dos níveis de IL-1 β e IL-1Ra dos casos no pré-tratamento e controles sadios, teste de Wilcoxon¹ para a comparação dos níveis das moléculas estudadas dos casos de hanseníase entre si (pré-PQT e demais fases do tratamento) e Modelo Linear Generalizado para medidas repetidas com quatro fatores (teste F)¹⁵, empregado para a comparação longitudinal dos níveis de IL-1 β e IL-1Ra nas diferentes fases do tratamento. Uma limitação dessa última análise foi o tamanho da amostra, uma vez que as moléculas foram avaliadas nos diferentes períodos (pré-PQT, 2ª dose, 6ª dose e pós-PQT) em apenas sete pacientes. Além disso, para as moléculas que apresentaram significância na comparação dos casos de hanseníase no pré-tratamento e controles sadios, foi utilizada a metodologia da curva ROC (Receiver Operating Characteristic)³⁴ para caracterizar o melhor ponto de corte das medidas analisadas para a predição de um caso positivo de hanseníase. Adotou-se como nível de significância 5%.

RESULTADOS

Os resultados demonstraram que a maioria dos pacientes era do sexo masculino, com média de idade de aproximadamente 50 anos, com mais de cinco lesões cutâneas e mais de um nervo acometido, classificados como dimorfos segundo a classificação de Madrid e como multibacilares (MB) pela classificação operacional; 37,8% dos casos apresentaram baciloscopia positiva e 64,9% positividade para o teste sorológico ML Flow.

Na comparação dos níveis de IL-1 β e IL-1Ra dos casos de hanseníase no pré-tratamento e controles sadios, houve diferença estatisticamente significativa somente (valor-p<0,05) para IL-1 β (**Figura 1**). Na comparação dos níveis das moléculas dos casos de hanseníase no pré-tratamento e demais fases (2ª dose, 6ª dose e pós-PQT), não houve diferença estatisticamente significativa para nenhuma das moléculas analisadas. O teste F também não

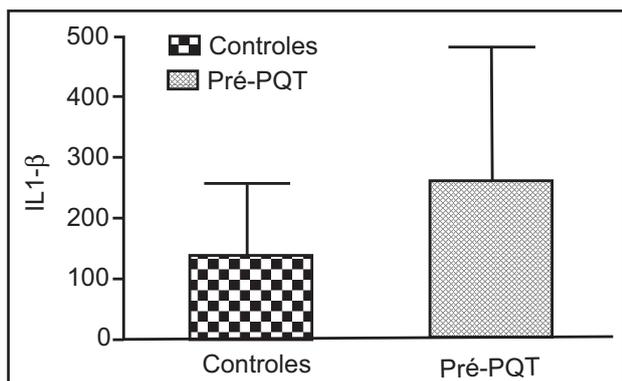


FIGURA 1

Comparação dos níveis de IL-1 β dos casos de hanseníase no pré-tratamento e controles sadios, Belo Horizonte, maio de 2006 a dezembro de 2007.

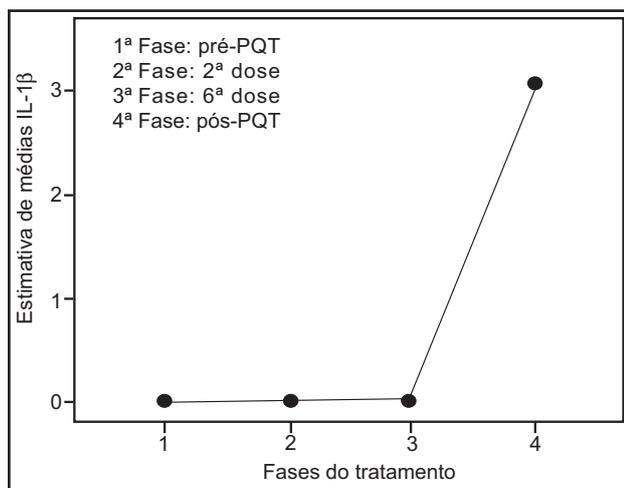


FIGURA 2

Representação gráfica das médias de IL-1 β nas quatro fases do estudo dos sete casos de hanseníase atendidos no Serviço de Referência em Dermatologia Sanitária do Hospital Eduardo de Menezes – FHEMIG, Belo Horizonte, maio de 2006 a dezembro de 2007.

evidenciou diferença estatisticamente significativa e o registro gráfico evidenciou uma tendência a um aumento na média marginal dos níveis de IL-1 β a partir da 6ª dose (equivalente à 3ª fase, assim como demonstrado na **Figura 2**). Além disso, de acordo com a Curva ROC, pacientes com níveis de IL-1 β superiores ao valor do ponto de corte estabelecido (0,015) seriam classificados como prováveis casos de hanseníase, com 75,7% de sensibilidade e 70% de especificidade (**Figura 3**).

Os níveis de IL-1Ra foram indetectáveis tanto para os casos de hanseníase quanto para os controles.

DISCUSSÃO

No presente estudo, em relação aos níveis de IL-1 β , constatou-se diferença estatisticamente significativa quando se compararam os casos de hanseníase no pré-tratamento e o grupo controle. Esse achado é concordante com o encontrado no estudo de Moubasher *cols*¹⁶, no qual pacientes de hanseníase não tratados mostraram níveis séricos significativamente elevados de IL-1 β e de outras moléculas estudadas (IFN- γ , IL-2R, IL-10 e TNF- α),

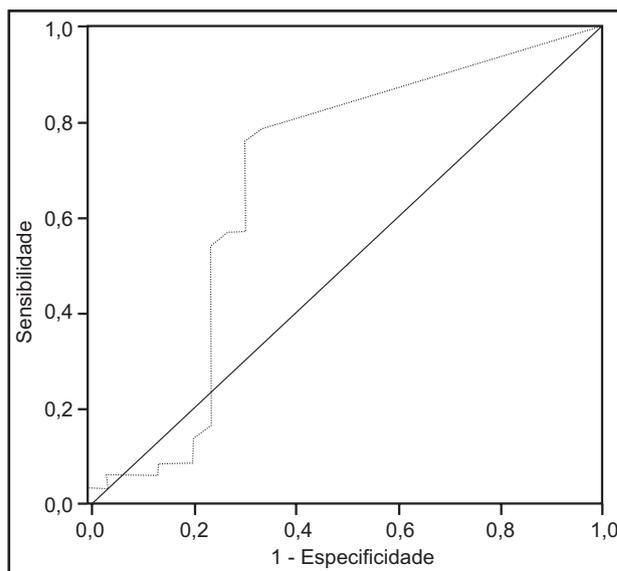


FIGURA 3

Curva ROC para as medidas de IL-1 β no pré tratamento como preditor de casos de hanseníase *versus* controles sadios, Belo Horizonte, maio de 2006 a dezembro de 2007.

detectados através do teste ELISA, quando comparados aos controles sadios. Assim, pode-se inferir que a liberação de IL-1 β nos casos de hanseníase pode representar um indício da ativação de uma resposta imune celular frente ao bacilo, conforme observado por Watson *cols*³⁵, em estudo no qual foram quantificadas a produção de IL-1 β e IL-2 por células aderentes mononucleares do sangue periférico de pacientes com diferentes formas de hanseníase.

Neste trabalho, não houve diferença estatisticamente significativa dos níveis de IL-1 β na comparação dos casos de hanseníase no pré-tratamento e demais fases do mesmo (2ª dose, 6ª dose e pós-PQT). Esses achados demonstram que os níveis da citocina em questão já se encontravam alterados antes do início do tratamento em função da carga bacilar, não sendo identificadas alterações séricas significativas ao longo da poliquimioterapia. Provavelmente, com a destruição maciça e redução dos bacilos viáveis, pode ocorrer a liberação de frações antigênicas que estariam causando um estímulo persistente com consequente estado de hiperreatividade imune e inflamatória^{5 12 29 30}. Sarno *cols*²⁷, por sua vez, identificaram níveis séricos significativamente elevados de IL-1 β em todos os pacientes das formas dimorfas tuberculóides testados, que não apresentavam reação, independentemente da duração da quimioterapia. No referido trabalho, os autores detectaram, também, taxas elevadas dessa citocina no soro de pacientes com hanseníase apresentando Eritema Nodoso Hansênico (ENH).

Em relação à comparação longitudinal dos níveis de IL-1 β , não foi observada diferença estatisticamente significativa nas diferentes fases do estudo (pré-PQT, 2ª dose, 6ª dose e pós-PQT) e a representação gráfica evidenciou uma tendência a um aumento na média marginal dos níveis dessa citocina a partir da 6ª dose. Este achado é discordante do encontrado por Moubasher *cols*¹⁶ que evidenciaram diminuição significativa dos níveis séricos de IL-1 β e de outras moléculas estudadas (IL-2R e IL-10) após um ano de tratamento em trinta e seis casos de hanseníase.

Entretanto, para essa análise, a presente amostra foi constituída por apenas sete pacientes e, portanto, considerada pequena para se elaborarem inferências. Contudo, os resultados apresentados nesse estudo sugerem que novas investigações ainda precisam ser realizadas para se determinar o efeito da terapia antimicrobiana prolongada na capacidade de produzir IL-1 β , questão já levantada anteriormente³⁵.

Ainda em relação aos níveis dessa citocina, a Curva ROC demonstrou moderado poder de predição para distinguir um caso positivo de hanseníase, com 75,7% de sensibilidade e 70% de especificidade.

Em relação à dosagem de IL-1Ra, molécula anti-inflamatória que inibe seletivamente os efeitos de IL-1 pela competição com o receptor de IL-1 na superfície celular, os resultados negativos encontrados tanto nos controles quanto nos casos de hanseníase estudados nas diversas fases do tratamento, podem ser justificados pelo fato de que os níveis estavam abaixo das concentrações detectadas pelo teste ELISA empregado.

Como limitações gerais do estudo, vale ressaltar as perdas de pacientes constatadas ao longo do seguimento, que não permitiram que fossem realizadas as coletas de sangue periférico em todas as fases do estudo e fatores relacionados ao paciente, tais como fatores genéticos, estado nutricional e uso paralelo de outros fármacos.

Embora existam evidências do papel das moléculas estudadas no curso da hanseníase, no presente estudo, pode-se concluir que ainda são necessárias novas investigações para avaliar a expressão e o papel de agonistas e/ou antagonistas nos efeitos pró ou anti-inflamatórios, para confirmar a presença de algumas dessas moléculas como marcadores preditivos da doença e para servir de parâmetro para o acompanhamento do estado imunológico dos pacientes em futuros ensaios clínicos. A melhor compreensão de seus mecanismos biológicos, ainda bastante complexos, poderá contribuir para novas abordagens terapêuticas.

AGRADECIMENTOS

Os agradecimentos à Dra. Maria Aparecida de Faria Grossi pelo exemplo profissional e incentivo à busca constante do conhecimento.

REFERÊNCIAS

- Arango HG. Bioestatística: teórica e computacional. 2ª edição. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.
- Araújo MG. Hanseníase no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 36: 373-382, 2003.
- Arend WP, Guthridge CJ. Biological role of interleukin 1 receptor antagonist isoforms. Annals of the Rheumatic Diseases 59: 60-64, 2000.
- Barreto JA, Belone AFF, Fleury RN, Soares CT, Lauris JRP. Manifestações de padrão tuberculóide reacional na hanseníase dimorfa: estudo histoquímico e imuno-histoquímico comparativo, em biópsias cutâneas, entre reações tipo 1 ocorridas antes e durante a poliquimioterapia. Anais Brasileiros de Dermatologia 80: 68-74, 2005.
- Cunha MGS. Episódios reacionais e relação com recidiva em doentes com hanseníase multibacilar tratados com diferentes esquemas terapêuticos. 2001. 163 f. Tese de Doutorado em Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP, Ribeirão Preto, 2001.
- Ferrero-Miliani L, Nielsen OH, Andersen OS, Girardin SE. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. Review. British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology 147: 227-235, 2006.
- Foss NT. Imunopatologia. In: Talhari S, Neves RG (eds) Hansenologia. 3ª edição. Gráfica Tropical, Manaus, cap.9, p.97-102, 1997.
- Foss, N.T. Hanseníase: aspectos clínicos, imunológicos e terapêuticos. Anais Brasileiros de Dermatologia, Rio de Janeiro 74: 113-119, 1999.
- Goulart IMB, Penna GO, Cunha G. Imunopatologia da Hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 35: 365-375, 2002.
- Harboe M. The immunology of leprosy. In: Hastings RC (ed) Leprosy. Churchill-Livingstone, Edinburgh, cap. 4, p.53-87, 1985.
- Hansson M, Ying G, Rosen H, Tapper H, Olsson I. Hematopoietic secretory granules as vehicles for the local delivery of cytokines and soluble cytokine receptors at sites of inflammation. European Cytokine Network 15: 167-176, 2004.
- Kassan SS, Moutsopoulos HM. Manifestações clínicas e diagnóstico precoce da Síndrome de Sjögren. Archives of Internal Medicine 164: 1275-1284, 2004.
- Kindler V, Sappino AP, Grau GE, Piguet PF, Vassalli P. The inducing role of tumour necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. Cell V 56: 731-740, 1989.
- Martelli CMT, Stefani MMA, Penna GO, Andrade ALSS. Brazilian epidemics and epidemics, challenges and prospects for scientific investigation: leprosy. Revista Brasileira de Epidemiologia 5: 273-285, 2002.
- Mccullagh P, Nelder JA. An Outline of Generalized Linear Models. In, Generalized Linear Models. 2nd Edition, Chapman & Hall, London, p. 21-47, 1989.
- Moubasher AEA, Kamel NA, Zedan H, Raheem DEA. Cytokines in leprosy, II. Effect of treatment on serum cytokines in leprosy. International Journal of Dermatology 37: 741-761, 1998.
- Munk ME, Anding P, Schettini AP, Cunha MG, Kaufmann SH. Soluble Tumor Necrosis Factor Alpha Receptors in Sera from Leprosy Patients. Infection and Immunity 67: 423-425, 1999.
- Noordeen SK. The epidemiology of leprosy. In: Hastings RC, Oromolla DVA (eds) Leprosy. Churchill-Livingstone, Edimburgh, cap.2, p.15-30, 1985.
- Oromolla DVA. Noções de Hansenologia. 2ª edição, Centro de Estudos Dr. Reynaldo Quagliato, Bauru, 2000.
- Pardillo EF, Fajardo TT, Abalos RM, Scollard D, Gelber RH. Methods for the Classification of Leprosy for Treatment Purposes. Clinical Infectious Diseases 44: 1096-1099, 2007.
- Pfaltzgraff RE, Bryceson A. Clinical Leprosy. In: Hastings RC (ed) Leprosy. Churchill Livingstone Inc. New York, p.134-176, 1985.
- Pimentel MIE, Nery JAC, Borges E, Gonçalves RR, Sarno EN. O exame neurológico inicial na hanseníase multibacilar: correlação entre a presença de nervos afetados com incapacidades presentes no diagnóstico e com a ocorrência de neurites francas. Anais Brasileiros de Dermatologia 78: 561-568, 2003.
- Rea TH, Modlin RL. In: Fitzpatrick, TB, Eisen AZ, Wolff K, Freedberg IL, Austen KF (eds) Tratado de Dermatologia, 5ª edição. Revinter Lida, Rio de Janeiro, v2, 2005.
- Rook GAW, Al Attiyah R. Cytokines and the Koch phenomenon. Tubercle 72: 13-20, 1991.
- Sampaio EP, Sarno EN. Expression and cytokine secretion in the states of immune reactivation in leprosy. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 31: 69-76, 1998.
- Santos APT, Almeida GG, Martinez CJ, Rezende C. Imunopatologia da hanseníase: aspectos clínicos e laboratoriais. NewLab 73: 142-156, 2005.
- Sarno EN, Grau GE, Vieira LMM, Nery J.A. Serum levels of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 during leprosy reactional states. Clinical and experimental immunology 84: 103-108, 1991.

28. Scollard DM, Adams LB, Gillis TP, Krahenbuhl JL, Truman RW, Williams DL. The continuing challenges of leprosy. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 338-381, 2006.
29. Silva CL, Foss NT. Tumor necrosis factor in leprosy patients. *Journal of Infectious Diseases* 159: 787-790, 1989.
30. Silva CL, Faccioli LH, Foss NT. Suppression of human monocyte cytokine release by phenolic glycolip 1 of *M. leprae*. *International Journal of Dermatology* 61: 107-118, 1993.
31. Talhari S, Neves RG. *Dermatologia Tropical: Hanseníase*. 3ª edição, Editora Tropical, Manaus, v.167, p.2-131. 1997.
32. Talhari S, Neves RG, Penna GO, Oliveira MLV. *Dermatologia Tropical: hanseníase*. 4ª edição, Editora Tropical, Manaus, 2006.
33. Van Brakel WH. Peripheral neuropathy in leprosy and its consequences. *Leprosy Review* 71: 146-153, 2000.
34. Van Der Schouw YT, Verbeek ALM, Ruijs JHJ. ROC curves for the initial assessment of new diagnostic tests. *Family Practice* 9: 506-511, 1992.
35. Watson S, Bullock W, Nelson K, Schauf V, Gelber R, Jacobson R. Interleukin 1 production by Peripheral Blood Mononuclear Cells from leprosy patients. *Infection and Immunity* 45: 787-789, 1994.