

## Transformação dos linfócitos induzida pela fitohemaglutinina e reação de Mitsuda

J. A. VOZZA (\*)  
 B. BEIGUELMAN (\*\*)  
 R. C. B. PISANI (\*\*)  
 P. C. CEZAR (\*)

RESUMO — A taxa de transformação blástica dos linfócitos induzida pela fitohemaglutinina, bem como os níveis de globulinas séricas foram investigados em soldados brasileiros caucasóides que apresentavam reação tardia à lepromina (reação de Mitsuda) fortemente positiva ou completamente negativa. Nenhum dos indivíduos examinados era comunicante de pacientes com hanseníase.

Os resultados obtidos permitem concluir que, em indivíduos sadios, nem a transformação dos linfócitos estimulada pela fitohemaglutinina, nem os níveis de globulinas séricas dependem da reação de Mitsuda.

A correlação negativa significativa entre o nível de globulinas não gama e a taxa de transformação blástica dos linfócitos provocada pela fitohemaglutinina, que é encontrada em pacientes lepromatosos, não foi observada nos indivíduos sadios que foram examinados.

*Termos indice:* Linfócitos. Fitohemaglutinina. Reação de Mitsuda. Globulinas séricas.

### INTRODUÇÃO

A transformação blástica dos linfócitos, estimulada *in vitro* pela fitohemaglutinina, tem sido objeto de numerosas investigações nos últimos anos, porque se considera que a taxa de células linfoblásticas produzidas nessas condições é uma medida indireta da capacidade imunológica do organismo.

No caso particular da hanseníase, contudo, essas investigações têm fornecido resultados contraditórios. Assim, apesar de muitos autores concordarem que os linfócitos dos pacientes lepromatosos apresentam resposta deficiente ao esti-

mulo da fitohemaglutinina (Rodriguez-Paradisi *et al.*, 1967, 1968; Dierks & Shepard, 1968; Bullock Jr. & Fasal, 1971; Wong *et al.*, 1971; Han *et al.*, 1971; Fliess *et al.*, 1972), outros afirmam que tal deficiência não existe (Sheagren *et al.*, 1967, 1969; Potier, 1969; Ulrich *et al.*, 1972). Por outro lado, Nelson *et al.* (1971), examinando chineses, malaios e indianos, somente verificaram resposta deficiente ao estímulo da fitohemaglutinina nos linfócitos de lepromatosos malaios e indianos, quando tais leucócitos eram cultivados em soro autólogo, mas não em soro heterólogo. Os linfócitos dos pacientes chineses, entretanto, mos-

(\*) Laboratório de Patologia Clínica.

(\*\*) Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, C.P. 1170, 13100 — Campinas, SP, Brasil.

traram maior taxa de transformação blástica que os de indivíduos normais, tanto em soro autólogo, quanto em soro heterólogo.

Ao investigar os fatores plasmáticos que poderiam, eventualmente, ser responsáveis pela variação dos resultados fornecidos pelos pacientes lepromatosos, Beiguelman *et al* (1975) constataram que os níveis sanguíneos de diaminodifenilsulfona não têm, in vivo, um efeito detectável sobre a transformação dos linfócitos, apesar de tal medicamento antileprótico deprimir a formação de linfoblastos, quando adicionado *in vitro* às culturas de leucócitos (Beiguelman & Pisani, 1974). No mesmo trabalho, porém, Beiguelman *et al.* (1975) assinaram, nas culturas de leucócitos de pacientes lepromatosos, que a proporção de linfócitos transformados pelo estímulo da fitohemaglutinina estava correlacionada negativa e significativamente com as frações não gama das globulinas séricas. Além disso, havia indicações de que as globulinas alfa<sub>2</sub>, eram as principais responsáveis por essa correlação. Tal observação, aliás, mostrou grande coerência com o trabalho de Cooperband *et al.* (1968), pois esses autores isolaram uma fração das globulinas alfa do plasma humano normal, capaz de inibir o efeito da transformação blástica induzida pela fitohemaglutinina.

Tendo em vista o exposto, e considerando que uma das características mais marcantes dos pacientes lepromatosos é a sua incapacidade de apresentar uma resposta tardia à inoculação de lepromina (reação de Mitsuda negativa), passava a ser de crucial importância verificar em indivíduos sadios, se:

1. a transformação dos linfócitos induzida pela fitohemaglutinina depende do tipo de reação de Mitsuda;
2. os níveis de globulinas séricas dependem da reação de Mitsuda;

3. a formação de linfoblastos induzida pela fitohemaglutinina está correlacionada significativamente às frações não gama das globulinas séricas.

## CASUÍSTICA E MÉTODOS

Uma amostra de 87 soldados brasileiros caucasóides, praticamente da mesma idade, que prestavam serviço militar na Escola Preparatória de Cadetes do Exército (Campinas, SP), foi inoculada com lepromina padrão fornecida pelo Serviço Nacional de Leprosia (Rio de Janeiro). Todos os soldados eram perfeitamente hígidos e nenhum era comunicante de hanseniano.

As inoculações intradérmicas de lepromina foram feitas na face anterior do braço, injetando-se 0,1 ml dessa suspensão de bacilos mortos por intermédio de seringas para insulina, providas de agulhas descartáveis (13 mm x 0,45 mm) As leituras da reação tardia à lepromina foram feitas sempre por dois dos autores (J.A.V. e P.C.C.) 30 dias depois da inoculação, e classificadas segundo Beiguelman (1971) em *reação 0* (ausência de reação local ou infiltração discreta com menos de 3 mm de diâmetro), *reação 1* (infiltração franca, nódulo com 3 até 5 mm de diâmetro) e *reação 2* (infiltração nodular com mais de 5 mm de diâmetro com ou sem ulceração). Os indivíduos que apresentaram reação 0 foram reexaminados 39 dias após a inoculação da lepromina, tendo em mente que, de acordo com Bechelli *et al.* (1963), os não comunicantes de hansenianos podem retardar a manifestação da reação de Mitsuda positiva.

Visto que 14 indivíduos (16,1%) da amostra estudada manifestaram reação tardia intensa à lepromina (reação 2), fez-se um sorteio, dentre aqueles com reação 0, para selecionar outros 14 com ausência total de reação local. Esses 28 indivíduos se prestaram a duas coletas de sangue. Uma, de 20 ml, necessária

à preparação das culturas de leucócitos, foi realizada com seringas esterilizadas e heparinizadas, enquanto a outra, de 5 ml, destinada à eletroforese de proteínas do soro, foi feita com seringas esterilizadas sem anticoagulante.

As culturas foram preparadas pela incubação do plasma rico em leucócitos durante 72 horas a 37°C em frascos esterilizados, tipo vidro de xarope, com capacidade de 90 ml, contendo 9 ml de meio de cultura com 0,1 ml de fitohemaglutinina preparados no Departamento de Genética Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. O meio de cultura foi constituído de 70% de solução fisiológica de Hanks enriquecida com 0,5% de hidrolisado de lactalbumina, 30% de soro fetal bovino, 100 UI/ml de penicilina e 100 ug/ml de estreptomina. Terminada a incubação, o conteúdo dos tubos era transferido para tubos cônicos submetidos a centrifugação durante 5 minutos a 1.000 r.p.m. Com os sedimentos eram feitos esfregados com metanol, os quais, depois de secos, eram corados com o reagente de May-Grunwald e Giemsa, de acordo com a técnica de Rosenfeld (1947). O percentual de linfócitos transformado em

linfoblastos foi obtido após contagem de, pelo menos, 600 células de cada cultura, multiplicando-se por 100 a razão entre o número de linfócitos transformados e o de não transformados.

Os soros das amostras de sangue sem anticoagulante foram submetidos aos procedimentos rotineiros da técnica de eletroforese em fitas de acetato de celulose, sendo as globulinas determinadas por densitometria em 500 nm, após coloração pelo Negro de Sudão, utilizando-se um densitômetro integrador Atago, modelo Quick.

## RESULTADOS

A tabela 1 apresenta a taxa de transformação blástica e os níveis de globulinas séricas nos 28 indivíduos examinados, grupados segundo a reação de Mitsuda. A tabela 2 mostra as médias e o desvio padrão de cada uma das características quantitativas examinadas nesses dois grupos, ou seja, com reação tardia à lepromina totalmente negativa e com reação fortemente positiva, enquanto a tabela 3 apresenta os resultados da análise de regressão múltipla da taxa de transformação blástica sobre os níveis de globulinas séricas.

TABELA 1

Percentual de transformação blástica e níveis de globulinas séricas apresentados pelos 28 indivíduos examinados.

REAÇÃO DE MITSUDA	TRANSFORMAÇÃO BLÁSTICA %	GLOBULINAS				
		TOTAL	ALFA1	ALFA2	BETA	GAMA
Totalmente Negativa	58,13	4,33	0,28	0,21	1,55	2,29
	61,54	3,60	0,40	1,05	0,94	1,21
	67,58	3,97	0,33	0,87	1,44	1,31
	49,88	4,18	0,31	1,07	0,99	1,81
	61,69	3,35	0,32	0,93	0,78	1,32
	56,00	4,29	0,42	0,95	0,81	2,11
	72,84	3,86	0,29	0,90	0,93	1,74
	63,98	3,25	0,47	0,60	0,73	1,45
	65,17	3,13	0,65	0,24	0,76	1,48
	70,90	3,41	0,42	0,83	0,61	1,55
	64,57	4,00	0,50	0,78	0,78	1,94
	63,43	3,59	0,57	0,57	0,82	1,63
	63,86	3,53	0,35	0,87	0,65	1,66
	55,75	3,44	0,40	0,97	0,70	1,37
Fortemente Positiva	57,57	3,77	0,35	1,04	0,74	1,64
	53,19	4,23	0,25	0,87	0,81	2,30
	61,25	3,96	0,36	0,91	0,78	1,91
	54,84	3,90	0,43	1,02	0,84	1,61
	59,50	3,87	0,33	0,94	0,94	1,66
	50,62	3,79	0,26	0,86	0,74	1,93
	64,11	3,91	0,24	0,94	1,00	1,73
	62,28	3,51	0,26	1,07	0,77	1,41
	64,76	3,28	0,35	0,48	0,86	1,59
	62,13	3,61	0,78	0,42	0,78	1,63
	54,09	3,37	0,57	0,77	0,61	1,42
	57,25	3,70	0,70	1,05	0,87	1,08
	57,72	3,28	0,39	0,65	0,87	1,37
	61,23	3,00	0,30	0,79	0,58	1,33

TABELA 2

Comparação das médias dos valores apresentados na tabela 1.  
(R. M. = reação de Mitsuda ; D. P. = desvio padrão)

CARACTERÍSTICA	R.M. NEGATIVA		R.M. POSITIVA		t	G.L.	P
	MÉDIA	D.P.	MÉDIA	D.P.			
Transformação blástica (%)	62,52	6,12	58,61	4,30	0,290	26	>0,70
Total de globulinas	3,71	0,39	3,66	0,33	0,034	26	>0,90
Globulinas alfa-1	0,41	0,11	0,40	0,17	0,060	26	>0,90
Globulinas alfa-2	0,77	0,27	0,84	0,20	-0,212	26	>0,80
Globulinas beta	0,89	0,28	0,80	0,11	0,263	13*	>0,70
Globulinas gama	1,63	0,32	1,62	0,30	0,015	26	>0,90

TABELA 3

Resultados da análise de regressão múltipla aplicada aos dados da tabela 1. O percentual de transformação blástica foi considerado como a variável dependente.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	COEFICIENTE DE REGRESSÃO	ERRO	t G.L. = 23	P
Globulinas alfa <sub>1</sub>	-7,510	9,482	-0,792	> 0,40
Globulinas alfa <sub>2</sub>	-8,825	5,297	-1,666	> 0,10
Globulinas beta	0,451	5,434	0,083	> 0,90
Globulinas gama	-6,997	3,946	-1,773	> 0,05

### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Na tabela 2 é fácil constatar que, em relação a todas as características quantitativas examinadas, as médias apresentadas pelos indivíduos com reação de Mitsuda totalmente negativa não diferiram significativamente daquelas verificadas nos indivíduos com reação de Mitsuda fortemente positiva. Os resultados dessa tabela indicam, portanto, que, nem a transformação blástica dos linfócitos, nem os níveis de globulinas séricas observados nos indivíduos sadios dependem da reação de Mitsuda, ou seja, de sua capacidade de responder à inoculação intradérmica de lepromina.

Os resultados apresentados na tabela 3 mostram, por sua vez, que a taxa de transformação blástica induzida pela fitohemaglutinina em linfócitos de indivíduos normais não depende de seus níveis de globulinas séricas, visto que nenhum dos coeficientes de regressão ali expostos difere significativamente de zero. Por outro lado, somando os níveis das globulinas não gama apresentados na tabela 1 e calculando o coeficiente de correlação entre esses valores e os percentuais de transformação blástica, pode-se constatar que também não existe correlação significativa entre essas variáveis ( $r = -0,14$  ;  $t = 0,721$  ; G.L. = 26;  $0,40 < P < 0,50$ ).

Em face desses resultados, como explicar, então, a correlação negativa significativa entre a taxa de transformação blástica dos linfócitos e os níveis de globulina não gama observada por Beiguelman *et al.* (1975) em pacientes lepromatosos, mormente quando se sabe que, nesses doentes, apenas os níveis de globulinas gama é que estão bastante aumentados, ocorrendo o oposto com as globulinas não gama?

A hipótese mais plausível que se pode aventar para explicar esses achados é aquela que considera que os doentes lepromatosos, apesar de mostrarem níveis baixos de globulinas não gama, devem produzir maior quantidade das frações que têm poder inibitório sobre a transformação dos linfócitos induzida pela fitohemaglutinina. Tal hipótese encontra apoio nas observações de Cooperband *et al.* (1968) porque, de acordo com esses autores, nem todas as preparações de globulinas alfa por eles isoladas apresentavam a mesma capacidade inibitória sobre a transformação blástica induzida pela fitohemaglutinina e, aquela que mostrava maior poder, continha uma globulina alfa, e duas alfa<sub>2</sub>. Passa, pois, a ser premente, agora, a investigação dessa hipótese em pacientes lepromatosos, tendo em vista as importantes implicações teóricas e práticas relacionadas ao problema em questão.

AGRADECIMENTOS

Os autores fazem questão de agradecer publicamente a valiosa colaboração prestada pelo Major Médico Dr. Emilio Araújo Rodrigues e pelo Capitão Médico Dr. Jair Matano, da Escola Preparatória de Cadetes de Campinas. Sem o apoio desses colegas, este trabalho não poderia ter sido realizado.

SUMMARY

The rate of lymphocyte transformation brought about by phytohemagglutinin as well as the serum globulins levels were investigated among healthy Brazilian caucasoid soldiers exhibiting either a strongly positive or a completely negative late lepromin reaction (Mitsuda reaction). None of them were contacts of leprosy patients.

It is concluded that among healthy individuals non contacts of leprosy patients neither the lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin, nor the serum globulins levels depend upon the Mitsuda reaction.

The significant negative correlation between the level of non gama globulins and the rate phytohemagglutinin induced lymphocyte transformation, which is found among lepromatous patients, could not be observed among the healthy individuals who were examined.

Key words: Lymphocyte. Phytohemagglutinin. Mitsuda's reaction. Serum globulins.

REFERÊNCIAS

- BECELLI, L. M.; GARCIA, G.; NAKAMURA, S.; QUAGLIATO, R. Determinação da data de leitura da reação de Mitsuda com lepromina integral em indivíduos sãos, sem exposição prévia conhecida ao *M. leprae*. In: CONG. INT. LEPROL., 8.º, Rio de Janeiro, 1963. *Anais*. v. 3, p. 284-294.
- BEIGUELMAN, B. Lepromin reaction. Genetics studies including twin pair analysis. *Acta Leprol.*, (44) : 5-65, 1971.
- BEIGUELMAN, B. & PISAM, R C. B. Effect of DDS on phytohemagglutinin induced lymphocyte transformation. *Int. J. Lepr.*, 42: 412-415, 1974.
- BEIGUELMAN, B.; PINTO JR., W.; PISANI, R. C. B.; KRIEGER, H.; VOZZA, J. A.; EL-GUINDY, M. M. Lymphocyte transformation and lepromatous leprosy. *Ciência e Cultura*, 27: 217-220, 1975.
- BULLOCK, W. E. & FASAL, P. Studies of immune mechanism in leprosy: III — The role of cellular and humoral factors in impairment of the *in vitro* immune response. *J. Immunol.*, 106: 888-899, 1971.
- COOPERBRAND, S. R.; BONDEVICK, H.; SCHMID, K.; MANNICK, J. A. Transformation of human lymphocytes: inhibition by homologous alpha globulin. *Science*, 159: 1243-1244, 1968.
- DIERKS, R. E. & SHEPARD, C. C. Effect of phytohemagglutinin and various mycobacterial antigens on lymphocyte cultures from leprosy patients. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127: 391-395, 1968.
- FLIESS, E. L.; BALINA, L. M.; BACHMANN, A. E.; CARDAMA, J. E.; GATTI, J. C. Alteraciones de la desdiferenciación linfoblástica en pacientes de lepra lepromatosa y sus consanguíneos sapos lepromino-negativos. *Leprologia*, 17: 83-90, 1972.
- HAN, S. H.; WEISER, R. S.; LIN, Y. C. Transformation of leprosy lymphocytes by lepromin tuberculin and phytohemagglutinin. *Int. J. Lepr.*, 39: 789-795, 1971. \_
- NELSON, D. S.; NELSON, M.; THURSTON, J. M.; WAITERS, M. F. R.; PEARSON, J. M. H. Phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 9: 33-43, 1967.
- POTTER, J. C. Sur la transformation lymphoblastique des lymphocytes de lépreux provoquée par broyat de lépreme murin. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, 62: 987-992, 1969.
- RODRIGUEZ-PARADISI, E.; BONAPARTE, Y. P.; MORGENFELD, M. C. Cultivo de linfócitos en enfermos con lepra lepromatosa. *Leprologia*. 12: 61-63, 1967.

*Transformação de linfócitos por fitohemaglutinina e Mitsuda*

- RODRIGUEZ-PARADISI, E.; BONAPARTE, Y. P.; MORGENFELD, M. C. Blasts in lepromatous leprosy. *Lancet*, 1: 308-309, 1968.
- ROSENFELD, G Corante pancrômico para hematologia e citologia clínica. Nova contribuição para componentes do May-Grüwald e do Giemsa num só corante de emprego rápido. *Mem. Inst. Butantan*, 20: 329-334, 1947.
- SHEAGREN, J. N.; BLOCK, J. B.; TRAUTMAN, J. R.; WOLF, S. M. Immunologic reactivity in patients with leprosy. *Ann. Intern. Med.*, 70: 295-302, 1969.
- ULRICH, M.; SALAS, B.; CONVIT, J . Lymphocyte transformation with phytomitogens in leprosy. *Int. J. Lepr.*, 40: 4-9, 1972.
- WONG, P. C.; CHAN-TEOH, C. H.; KENDALL, F H Transformation of lymphocytes by phytohemagglutinin in leprosy sera. *Int. J. Lepr.*, 39: 7-13, 1971.

Recebido para publicação em 25 de março de 1977.