

## Taxa de monócitos e de linfócitos e reação de Mitsuda em indivíduos sadios não comunicantes de hansenianos

J. A. VOZZA (\*)  
B. BEIGUELMAN (\*\*)  
P. C. CÉSAR (\*)

RESUMO — A freqüência de monócitos, linfócitos e soma de monócitos e linfócitos foi investigada em duas amostras de soldados brasileiros sadios, que foram inoculados intradermicamente com 0,1 ml de lepromina padrão. As idades dos soldados variaram entre 18 e 20 anos e nenhum deles era comunicante de hanseniano. Uma das amostras era composta de 87 indivíduos (40 Mitsuda negativos, 33 Mitsuda moderadamente positivos e 14 Mitsuda fortemente positivos) e a outra era constituída por 96 pessoas (57 Mitsuda negativos, 28 Mitsuda moderadamente positivos e 11 Mitsuda fortemente positivos).

Nas duas amostras, a média da freqüência de monócitos apresentada pelos indivíduos Mitsuda fortemente positivos foi numericamente, embora não significativamente, maior que as apresentadas pelos indivíduos Mitsuda negativos e moderadamente positivos. Essa tendência não foi constatada em relação às freqüências médias dos linfócitos e soma de monócitos e linfócitos, as quais não diferiram significativamente nos grupos de indivíduos das três classes de reação de Mitsuda.

*Termos índice:* Monócitos. Linfócitos. Lepromina. Reação de Mitsuda. Antígeno de Mitsuda.

### INTRODUÇÃO

Ao analisar os hemogramas de 54 indivíduos caucasóides adultos, um dos autores (Vozza, 1972) constatou que a freqüência de monócitos circulantes estava correlacionada à intensidade da reação tardia à lepromina (reação de Mitsuda) por eles apresentada. Assim, a média de monócitos por mm<sup>3</sup> de sangue foi igual a 221,1 entre aqueles com reação de Mitsuda negativa, 272,7 entre os que apresentavam essa reação moderadamente positiva e 410,1 entre aqueles que exibiam reação de Mitsuda fortemente positiva. Quanto aos linfócitos, não foi possível assinalar correlação

significativa entre sua taxa e a intensidade da reação "tardia à lepromina.

Tal observação, apesar de nova e de eventual valor teórico e prático, não foi considerada surpreendente. De fato, em que pese a ênfase que se vem dando ao papel dos linfócitos nas alterações imunológicas apresentadas pelos hansenianos (Dierks & Shepard, 1968; Turk & Waters, 1968; Bullock, & Fasal, 1968; Han *et al.*, 1971, entre outros), sabe-se desde as observações pioneiras de Mitsuda (1919, *cf.* Hayashi, 1933) que os macrófagos desempenham papel de crucial importância na resposta tecidual à inoculação de lepromina (Hayashi, 1933; Schujman, 1936; Nagai, 1938; Alayon,

(\*) Laboratório de Patologia Clínica.

(\*\*) Departamento de Genética Médica, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, C. P. 1170, 13.100 — Campinas, SP, Brasil.

1939; Alayon & Soma-Lima, 1940; Nolasco, 1940; Biingeler & Fernandez, 1940; Rodriguez, 1950; Yokota, 1953; Lopes de Faria, 1953; Bechelli *et al.*, 1959; Azulay *et al.*, 1960; Andrade, 1962; Garrido-Neves, 1962). Além disso, os estudos sobre o comportamento, face ao *Mycobacterium leprae*, dos monócitos que se transformam in *vitro* em células com aparência de histiócitos (Benewolenskaja, 1932; Treo & Silva, 1963; Beiguelman, 1966, 1967, 1968, 1971<sub>b</sub>; Pisani *et al.*, 1973) não deixam dúvidas quanto à importância desses elementos celulares na resposta à infecção leprotica.

Entretanto, levando em conta que a amostra analisada por Vozza (1972) era bastante heterogênea, pois incluía indivíduos de ambos os sexos, comunicantes e não comunicantes de hansenianos, que apresentavam grande variação quanto à idade, além de pertencerem a estratos sociais diferentes, não se excluiu o risco de que aquela correlação assinalada pudesse ser espúria. Em vista disso, e tendo em mente a importância do problema, os autores consideraram que ele deveria ser reinvestigado inicialmente em uma amostra homogênea de indivíduos da mesma idade, mesmo sexo e vivendo nas mesmas condições ambientes.

#### CASUÍSTICA E MÉTODO

Os indivíduos sadios não comunicantes de doentes de lepra que se prestaram voluntariamente a esta investigação eram soldados com 18 a 20 anos de idade, que prestavam serviço militar na Escola Preparatória de Cadetes de Campinas, SP, durante os anos de 1974 e 1975. Tais soldados constituíram, pois, duas amostras. Uma, coletada em 1974, e daqui por diante denominada de amostra I, era composta inicialmente de 104 voluntários, dos quais restaram 87 para estudo. A outra, coletada em 1975, e doravante designada por amostra II, era composta inicialmente por 104 indivíduos, dos quais 96 foram estudados.

Os componentes das duas amostras foram inoculados com 0,1 ml de lepromina padrão fornecida pelo Serviço Nacional de Lepra (Rio de Janeiro) na face anterior do braço, sempre no horário entre 13 e 14 horas, ocasião em que eram colhidos 5 ml de sangue venoso de cada indivíduo para o exame hematológico. Visto que a colheita de sangue de todos os indivíduos foi feita nesse horário, a eventual distorção introduzida na contagem de células sanguíneas foi sistemática e, portanto, considerada como incapaz de afetar os objetivos da presente investigação.

As injeções intradérmicas de lepromina foram realizadas com seringas esterilizadas para injeção de insulina, munidas de agulhas descartáveis (13 mm x 0,45 mm). O sangue colhido em seringas esterilizadas, também munidas de agulhas descartáveis (25 mm x 0,8 mm), era imediatamente transferido para frascos contendo 0,1 ml de solução de EDTA sódico a 10%.

As leituras da reação de Mitsuda foram feitas independentemente por dois dos autores (J.A.V. e P.C.C.) 30 dias depois da inoculação, sendo as respostas negativas e positivas fracas reavaliadas 39 dias após a injeção de lepromina, já que entre os não comunicantes de hansenianos a reação à lepromina pode ser mais tardia que entre os comunicantes (Bechelli *et al.*, 1963).

Para a classificação da reação de Mitsuda os critérios utilizados foram propostos por Beiguelman (1971), o qual considera três classes de reação. Assim, a reação 0 significa ausência de reação local ou infiltração discreta com menos de 3 mm de diâmetro, a reação 1 inclui os infiltrados francos, com nódulo entre 3 mm até 5 mm de diâmetro e a reação 2 indica a infiltração nodular com mais de 5 mm de diâmetro, com ou sem ulceração.

O exame hematológica constou da contagem global de eritrócitos, dosagem de hemoglobina, determinação do índice

hematócrito, cálculo dos índices de cor, de concentração de hemoglobina corpuscular média e da hemoglobina corpuscular média, determinação do número global de leucócitos e contagem específica dos mesmos. Na amostra I as contagens globais foram realizadas em câmaras de contagem do tipo Neubauer melhorada, de acordo com as técnicas clássicas, sendo as dosagens de hemoglobina realizadas pelo método da cianometemoglobina (Van Kampen & Zijlstra, 1961) com reagentes padrão da marca Merck e um espectrofotômetro Coleman Jr. II. Na amostra II as contagens foram realizadas com um contaglôbulos Coulter, modelo D2, sendo a dosagem de hemoglobina feita em um hemoglobinômetro Coulter, aferido com padrões internacionais. Nas duas amostras a contagem específica dos leucócitos foi realizada em esfregaços corados com o corante de Leishman, contando-se um total de 100 leucócitos na periferia e centro do esfregaço.

Tendo em vista que, para atingir o objetivo do presente trabalho, somente interessavam as contagens de monócitos e de linfócitos, apenas os dados referen-

tes a esses elementos da série branca, bem como à soma deles, serão aqui apresentados. Além disso, convém mencionar que, para analisar esses dados com técnicas que exigem variáveis com distribuição normal, foram tomados os logaritmos dos valores originais a respeito das contagens de leucócitos.

### RESULTADOS

A tabela 1 apresenta a taxa média e o desvio padrão de monócitos, de linfócitos e da soma desses dois elementos da série branca nos indivíduos das três classes de reação de Mitsuda das duas amostras estudadas, calculados com base nos logaritmos dos valores originais. A mesma tabela apresenta as médias dessas taxas e o intervalo de confiança da média, com probabilidade de 95%, dos dados reconvertidos.

Visto que os resultados do teste de Bartlett (1937), feito com a finalidade de verificar se as variâncias podiam ser consideradas homogêneas, e também apresentados na tabela X, falaram a favor dessa hipótese, as médias obtidas foram comparadas por análise da variância.

TABELA 1

Taxa média de monócitos, linfócitos e soma de monócitos e linfócitos nos indivíduos das -três classes de reação de Mitsuda (R.M.) das duas amostras estudadas, com os valores tomados em logaritmo (x log) e reconvertidos, desvio padrão das distribuições dos logaritmos dos valores (s log) e intervalo de confiança da média de 95% de probabilidade.

#### AMOSTRA I

LEUCOCITOS	R.M.	N.º	$\bar{x}$ log	$s$ log	MÉDIA	INTERVALO
Monócitos	0	40	2,531	0,133	340	308 - 374
	1	33	2,493	0,120	311	282 - 344
	2	14	2,545	0,147	351	289 - 427
Homogeneidade de $s^2$ : $\chi^2(2) = 0,960$ ; $P > 0,50$						
Linfócitos	0	40	3,460	0,094	2884	2962 - 3090
	1	33	3,485	0,135	3055	2735 - 3412
	2	14	3,523	0,126	3334	2818 - 3944
Homogeneidade de $s^2$ : $\chi^2(2) = 3,993$ ; $P > 0,10$						
Monócitos + Linfócitos	0	40	3,511	0,089	3243	3041 - 3459
	1	33	3,529	0,127	3381	3048 - 3750
	2	14	3,568	0,122	3698	3140 - 4355
Homogeneidade de $s^2$ : $\chi^2(2) = 4,870$ ; $P > 0,05$						

Vozza et al.  
AMOSTRA II

LEUCÓCITOS	R.M.	N.º	$\bar{x}$ log	$s$ log	MÉDIA	INTERVALO
Monócitos	0	57	2,585	0,141	385	352 - 420
	1	28	2,577	0,122	378	339 - 421
	2	11	2,619	0,150	416	330 - 524
Homogeneidade de $s^2 : \chi^2(2) = 0,479 ; P > 0,70$						
Linfócitos	0	57	3,526	0,123	3357	3119 - 3614
	1	28	3,482	0,119	3033	2735 - 3365
	2	11	3,481	0,089	3027	2636 - 3475
Homogeneidade de $s^2 : \chi^2(2) = 1,813 ; P > 0,30$						
Monócitos + Linfócitos	0	57	3,576	0,116	3767	3516 - 4036
	1	28	3,536	0,105	3436	3126 - 3776
	2	11	3,541	0,087	3475	3041 - 3972
Homogeneidade de $s^2 : \chi^2(2) = 0,223 ; P > 0,80$						

Os resultados da análise da variância estão apresentados na tabela 2, na qual se pode verificar que os valores de F indicam que as médias das taxas de monócitos, de linfócitos e da soma de mo

nócitos e linfócitos nos indivíduos das três classes de reação de Mitsuda das amostras I e II não podem ser consideradas como significativamente diferentes.

TABELA 2

Comparação por análise da variância das taxas médias de monócitos, linfócitos e soma de monócitos e linfócitos apresentadas pelos indivíduos com as três classes de reação de Mitsuda das duas amostras.

AMOSTRA	VARIACÃO	G.L.	MONÓCITOS		LINFÓCITOS		AMBOS	
			$s^2$	F	$s^2$	F	$s^2$	F
I	Entre	2	0,019	1,12	0,022	1,69	0,017	1,42
	Dentro	84	0,017		0,013		0,012	
II	Entre	2	0,009	0,75	0,023	1,64	0,018	1,50
	Dentro	93	0,012		0,014		0,018	

### DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apesar de a análise da variância aplicada aos dados das duas amostras estudadas indicar que as taxas médias de monócitos não diferem significativamente nos indivíduos das três classes de

reação de Mitsuda, não se pode deixar de notar nos dados da tabela 1 que, nas duas amostras, a taxa média de monócitos foi numericamente maior entre os indivíduos com reação de Mitsuda fortemente positiva (reação 2).

Na mesma tabela 1 também chama a atenção, que a distribuição dos indivíduos segundo a reação de Mitsuda é, nas duas amostras estudadas, típica das populações constituídas por não comunicantes de hansenianos (Beiguelman, 1971a). De fato, os dados dessa tabela mostram baixa frequência de indivíduos com reação de Mitsuda fortemente positiva (reação 2) tanto na amostra I (16,1%), quanto na amostra II (11,5%), em contraste com a alta frequência de indivíduos com respostas negativas (46% na amostra I e 59,4% na amostra II) ou moderadas, isto é, reação 1 (37,9% na amostra I e 29,2% na amostra II). Aqui, aliás, é interessante salientar que as proporções observadas nas duas amostras não diferiram significativamente ( $X^2_{(2)} = 3,298$ ;  $0,10 < P < 0,20$ ).

Diante dessas observações não se pode, pois, afastar a hipótese de que a taxa significativamente maior de monócitos

assinalada por Vozza (1972) em indivíduos com reação de Mitsuda fortemente positiva não seja espúria, mas apenas passível de ser detectada em comunicantes de hansenianos. Em outras palavras, é plausível supor que a tendência ao aumento da taxa de monócitos em indivíduos com reação de Mitsuda fortemente positiva, observada nas duas amostras de não comunicantes de hansenianos, se acentue nos comunicantes de pacientes com essa moléstia. Obviamente, tal hipótese somente poderá ser aceita depois de posta à prova em uma amostra composta exclusivamente por comunicantes de hansenianos.

#### 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 frequency of monocytes, lymphocytes and monocytes plus lymphocytes was investigated in two samples of healthy Brazilian soldiers who were inoculated intradermally with 0.1 ml of standard lepromin. Their ages varied from 18 to 20 years and none of them were contacts of leprosy patients. One sample was composed of 87 individuals (40 negative, 33 moderately positive and 14 strongly positive Mitsuda reactors) and the other included 96 persons (57 negative, 28 moderately positive and 11 strongly positive Mitsuda reactors).

In both samples the mean frequency of monocytes presented by the strongly positive Mitsuda reactors was face value, though not significantly, higher than those presented by the moderately positive and negative Mitsuda reactors. This tendency was not observed in the mean frequencies of lymphocytes and monocytes plus lymphocytes, which did not differ significantly among the groups of individuals belonging to the three classes of Mitsuda's reactions.

Key words: Monocytes. Lymphocytes. Lepromin. Mitsuda's reaction. Mitsuda's antigen.

#### REFERÊNCIAS

- ALAYON, F. L. Histologia do lepromin-test nos lepromatosos. *Rev. Bras. Leprol.*, 7: 3-4, 1939.
- ALAYON, F. L. & SOUZA-LIMA, L. Sobre a histologia da reação de Mitsuda em lepromatosos. Nova contribuição ao seu estudo. *Rev. Bras. Leprol.*, 8: 367-374, 1940.
- ANDRADE, L. M. C. Comparação entre os aspectos microscópicos e macroscópicos do teste leprominico. *Bol. Serv. Nac. Lepra*, 21: 95-124, 1962.
- AZULAY, R. D.; ANDRADE, L. M. C.; SILVA, C.; RABELLO NETO, A. V.; AZULAY, J. D.; GARRIDO-NEVES, R.; MIGUEZ ALONSO, A. Comparison of the macroscopic readings and microscopic findings of the lepromin reaction. *Int. J. Lepr.*, 28: 38-43, 1960.

- BARTLETT, M. S. Some examples of statistical methods of research in agriculture and applied biology. *I. Royal Stat. Soc. (London)* 4(suppl.): 137-170, 1937.
- BECHELLI, L. M.; RATH.DE SOUZA, P.; QUAGLIATO, R. Correlação entre os resultados da leitura clínica e do exame histopatológico da reação de Mitsuda. *Rev. Bras. Leprol.*, 27: 172-182, 1959.
- BECHELLI, L M ; GARCIA, G.; NAKAMURA, S.; QUAGLIATO, R. Determinação da data da 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. Further results on the genetics of leprosy resistance. In: INT. CONG. HUMAN GENET., 3th, Chicago, 1966. Abstracts of Contributed Paper. p. 6-7.
- BEIGUELMAN, B. Leprosy and genetics. A review of past research with remarks concerning further investigations. *Bull. W. H. O.*, 37: 461-476, 1967.
- BEIGUELMAN, B. Some remarks on the genetics of leprosy resistance. *Acta Genet. Med. Gemell.*, 17: 584-594, 1968.
- BELGUELMAN, B. Lepromin reaction: genetics studies including twin pair analysis. *Acta Leprol.*, (44): 5-65, 1971.
- BEIGUELMAN, B. Fate of *Mycobacterium leprae* in macrophages. *Int. J. Lepr.*, 39: 896, 1971.
- BENEWOLENSKAJA, S. W. Ueber die in-vitro•reaktion der embryonalen. Gewebe and Leukozyten des Menschen auf Leprabazillen. *Arch. exp. Zellforsch*, 13: 37-46, 1932.
- BULLOCK, 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: 888-889, 1971.
- BÜNGELER, W. & FERNANDEZ, J. M. M. Estudo clinico e histopatológico das reações alérgicas na lepra: 1.a Parte Investigações clínicas sobre a reação à lepromina (reação de Mitsuda). *Rev. Bras. Leprol*, 8: 157-170, 1940.
- DIERKS, R. E. & SHÉPARD, C. C. Effect of phytohemagglutinin and various mycobacterial antigens on lymphocyte cultures from leprosy patients. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 127: 391-395, 1968.
- GARRIDO-NEVES, R. Interpretação das reações limitrofes ou duvidosas do teste lepromínico. *Bol. Serv. Nac. Lepra*, 21: 35-60, 1962.
- HAN, S. H.; WEISER, R. S. & LIN, Y. C. Transformation of leprosy lymphocytes by leprolin, tuberculin and phytohemagglutinin. *Int. J. Lepr.*, 39: 789-795, 1971.
- HAYASHI, F. Mitsuda's skin reaction in leprosy. *Int. J. Lepr.*, 1: 31-38, 1933.
- LOPES DE FARIA, J. *Contribuição ao conhecimento da natureza da reação de Mitsuda*. Rio de Janeiro, Serv. Nac. Lepra, 1953. 197 p.
- NAGAI, K. Histopatologische Befunde nach Anstellung der Mitsuda'schen Reaktion. *Lepro*, 9: 26, 1938.
- NOLASCO, J. O. The lepromin test in lepra reaction: II - histology of the reaction lesions and persistence of the injected bacilli. *Int. J. Lepr.*, 8: 285-296, 1940.
- PISANI, R C. B.; BEIGUELMAN, B.; OPROMOLLA, D. V. A. *In vitro* behavior of blood derived macrophages against killed *M. leprae*. *Int. J. Lepr.*, 41: 14-24, 1973.
- RODRIGUEZ, R. P. Reacción de Mitsuda: estudio histopatológico. *Bol. Soc. Cubana Dermat.* 7: 1-16, 1950 apud *Int. J. Lepr.*, 18: 442-443, 1950.
- SCHUJMAN, S. Histopatologia de la reacción de Mitsuda\_ Estudio progresivo y comparativo de las reacciones que provoca en las diferentes formas de lepra. *Rev. Bras. Leprol.*, 4:469-475, 1936.
- TREO, M. M. & SILVA, C. O. Comportamento do *Mycobacterium leprae in vitro* em sangue total ou plasma de leprosy de diferentes formas clínicas. In: CONG. INT. LEPROL., 8.º, Rio de Janeiro, 1963. *Anais*. v. 3, p. 484-494.
- TURK, J. L. & WATERS, M. F. R. Cell-mediated immunity in patients with leprosy. *Lancet*, 2:436-438, 1968.
- VAN KAMPEN, E. J. & ZIJLSTRA, W. G. apud HENRY R.J. *Clinical Chemistry*, New York, Harper & Row Publ. Inc., 1964.
- VOZZA, J. A. Eventual correlação entre intensidade da reação de Mitsuda e freqüência de monócitos no sangue periférico. Apresentado ao CONG. SOC PATOL. CLIN., 8º, Curitiba, 1972.
- YOKOTA, T. The histopathological study of Mitsuda reaction in the case of lepromatous leprosy. *Lepro*, 22: 232-235, 1953.

Recebido para publicação em 21 de março de 1977.