

ESTUDOS IMUNOQUÍMICOS NA HANSENÍASE

II - QUANTIFICAÇÃO DE IMUNEGLOBULINAS SÉRICAS. TENTATIVA DE ASSOCIAÇÃO COM A REAÇÃO DE RUBINO

O. P. SILVA (*)

R. G. FERRI (**)

N. MORAES (***)

A. L. V. MARQUES (****)

RESUMO — Foram analisados soros de 60 pacientes de hanseníase virchoviana (30 Rubino positivos e 30 Rubino negativos) e de 16 hansenianos tuberculóides (Rubino negativos), através da quantificação de imunoglobulinas pela técnica da imunodifusão radial simples. Observou-se aumento dos níveis de IgG e IgA nos dois grupos virchovianos. Os níveis de IgM mostraram-se aumentados apenas no grupo virchoviano Rubino positivo. Os níveis de IgD estiveram normais nos três grupos. Os pacientes tuberculóides exibiram aumento apenas de IgG. Os resultados sugerem que o grupo Rubino positivo ou é mais estimulado antigenicamente, ou responde com maior intensidade ao estímulo antigênico.

Termos índice: Hanseníase. Reação de Rubino. Eletroforese. Imunoeletroforese. Imunodifusão radial

Key words: Hanseniasis. Rubino's reaction. Electrophoresis. Immunoelectrophoresis. Radial immunodiffusion.

(*) Prof. Assist. Doutor da Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Depto. de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

(**) Prof. Livre-Docente do Depto. de Microbiologia e Imunologia do ICB-USP; Chefe do Centro de Pesquisas Imunoquímicas (CPI) do ICB-USP.

(***) Professor Titular do Depto. de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, responsável pela análise estatística.

(****) Prof. Colaborador. Responsável pela Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Depto. de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-CSP.

INTRODUÇÃO

No primeiro estudo desta serie (15), que visa a caracterização de pacientes de hanseníase, com base nas propriedades exibidas pelos soros com ou sem capacidade de aglutinosedimentar hemácias formoladas de carneiro, segundo a técnica de Rubino, pesquisamos o comportamento eletro e imunoelctroforético de soros de hansenianos sob tratamento no Hospital "Lauro de Souza Lima", de Bauru. No presente trabalho apresentamos os resultados da quantificação das imunoglobulinas IgG, IgA, IgM e IgD nos soros do mesmo grupo de pacientes, através da imunodifusão radial simples. A exceção da IgE, cujos níveis baixíssimos no soro não podem ser detectados por essa metodologia, as demais imunoglobulinas já foram quantificadas na hanseníase.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros. Analisamos soros de hansenianos virchovianos e tuberculóides, os primeiros divididos em 2 grupos de 30 pacientes cada um, classificados em Rubino positivos e negativos, constituindo os últimos um único grupo de 16 pacientes Rubino negativos, após a execução da reação descrita por Rubino (11), em 1931. Como controles utilizamos 35 soros normais de doadores de sangue do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira".

Placas para imunodifusão radial. Utilizamos placas "Tri-Partigen" — Behringwerke AG, para a quantificação de IgG, IgA e IgM. Para a dosagem de IgD, "Immunoplates" Hyland e placas por nós elaboradas no CPI, utilizando soro

imune de coelho anticadeia delta humana, referência 116 do CPI.

Soros de referência. Como padrões, para a construção das curvas de referência, empregamos os soros "Tri-Partigen" — Behringwerke AG, dosando : 44mg/100 ml (5,1 UI/ml), 98 mg/100 ml (11,31 UI/ml) e 163 mg/100 ml (18,71 UI/ml), para a IgG; 68 mg/100 ml (40 UI/ml), 173 mg/100 ml (103 UI/ml) e 322 mg/100 ml (192 UI/ml), para a IgA; 46 mg/100 ml (53 UI/ml), 135 mg/100 ml (155 UI/ml) e 258 mg/100 ml (297 UI/ml), para a IgM, e padrões Hyland, para a IgD, dosando: 4,3; 6,4 e 9,6 mg/100 ml.

Quantificações. Fizemos as quantificações segundo o método de Mancini *et al.* (8), que utiliza o princípio da reação a termo, com leituras no imunoscópio de projeção (*), após difusão de 80 horas, para a IgM, e de 48-50 horas para as demais imunoglobulinas.

Na maioria dos soros, principalmente os de virchovianos, tivemos que fazer diluições em salina, para a quantificação das três imunoglobulinas principais, e multiplicar os resultados pelo fator de diluição. Em geral, diluíamos a IgG, 1:30, a IgM, 1:2-1:3 e a IgA, 1:3.

RESULTADOS

Como os resultados obtidos não seguem distribuição normal, foram analisados por meio de testes não paramétricos. Todavia, como é tradicional a apresentação da média, desvio padrão, erro padrão e mediana, pela maioria dos autores, para exprimir seus resultados, esses dados são encontrados na tabela I.

Fizemos as seguintes comparações:

(*) Equipamento ótico de Carl Zeiss: projetado por R. G. Ferri & N. Geisdhovel.

T A B E L A I

Média, desvio padrão, erro padrão e mediana da quantificação das imunoglobulinas de indivíduos normais e dos três grupos de pacientes (mg/100ml)

Imunoglobulina	NORMAIS		VIRCHOVIANO RUBINO +		VIRCHOVIANO RUBINO --		TUBERCULÓIDE RUBINO --	
	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão
IgG	1235* (142UI/ml)	252,0 42,6	2462 (284UI/ml)	715,4 131,0	2342 (270UI/ml)	795,4 145,2	1722 (198UI/ml)	629,5 157,4
IgA	204 (121UI/ml)	73,4 12,4	488 (290UI/ml)	205,8 37,6	445 (264UI/ml)	226,7 41,4	317 (188UI/ml)	229,4 57,3
IgM	173 (199UI/ml)	70,2 11,9	414 (476UI/ml)	282,7 51,6	207 (238UI/ml)	103,9 19,0	149 (171UI/ml)	59,3 14,8
IgD	--	--	--	--	--	--	--	--
								2,50

* 1 mg = 11,53 UI para a IgG; 59,32 UI para a IgA e 115,04 UI para a IgM

Indivíduos normais >< os três grupos de pacientes tomados isoladamente. Utilizando o teste de Mann-Whitney (14), comparamos os níveis de imunoglobulinas de cada grupo de pacientes com o

grupo de indivíduos normais, observando o aumento significativo da IgG, em todos os grupos, da IgA, nos grupos virchovianos e da IgM, apenas no grupo virchoviano Rubino positivo (tabela II).

TABELA II
Quantificação de imunoglobulinas

Comparação dos níveis de imunoglobulinas entre os indivíduos normais e os três grupos de pacientes através do teste de Mann-Whitney

Grupos	IgG	IgA	IgM	IgD
Virchoviano Rubino positivo	6,923 [*]	5,620 [*]	5,270 [*]	-1,497
Virchoviano Rubino negativo	6,172 [*]	5,284 [*]	0,803	0,851
Tuberculóide Rubino negativo	2,985 [*]	1,198	-1,035	0,042

^{*} Significante

Valor crítico para $z = 1,64$

Comparação entre os três grupos de hansenianos. A fim de verificarmos se existiam diferenças significantes entre os três grupos de pacientes, empregamos o teste de Kruskal-Wallis (14) para fazer a comparação. Conforme se verifica na tabela III, com exceção da IgD, houve diferença significativa para as demais imunoglobulinas. Fazendo a comparação apenas entre os grupos virchovianos, pelo teste de Mann-Whitney, verificamos que os mesmos comportaram-se diferentemente, somente com

relação à IgM ($z = 4,089$). Assim sendo, as discordâncias detectadas pela análise de Kruskal-Wallis quanto a IgG e IgA, indicadas na tabela III, resultaram de diferenças entre os grupos virchovianos e tuberculaide.

Indivíduos que já apresentaram X indivíduos que não apresentaram surtos reacionais tipo EN. Utilizando o teste de Mann-Whitney, não encontramos diferença significativa entre os níveis de imunoglobulinas de pacientes sujeitos e dos não sujeitos à reação do tipo

TABELA III

Comparação entre os três grupos de hansenianos com relação à IgG, IgA, IgM e IgD, através do teste de Kruskal-Wallis

Imunoglobulina	Valores de H
IgG	11,351 [*]
IgA	8,659 [*]
IgM	29,466 [*]
IgD	4,863

^{*} Significante

Valor crítico para $H = 5,99$ (distribuição χ^2 com dois graus de liberdade)

eritema nodoso, dentro de um mesmo grupo, tanto para o grupo virchoviano Rubino positivo, como para o grupo virchoviano Rubino negativo.

Correlação entre a fração gama globulina eletroforética e a IgG quantificada em imuno placa. Estudamos, em todos os grupos, a correlação entre os valores da fra-

Estudo imunológico na hanseníase (II)

ção gama eletroforética e os níveis de IgG obtidos na quantificação, através do coeficiente de Spearman (14). Na tabela IV estão os valores dos coeficientes de corre-

ção e respectivos valores de "t". Encontramos em todos os grupos altíssima correlação entre a fração gama e a IgG.

T A B E L A I V

Correlação entre os níveis de IgG e a fração gama eletroforética através do coeficiente de Spearman

Grupos	Valores de r_s	Valores de t	t crítico
Virchoviano Rubino +	0,919	$t_{28} = 12,342^*$	2,048
Virchoviano Rubino —	0,896	$t_{28} = 10,699^*$	2,048
Tuberculóide Rubino —	0,912	$t_{14} = 8,299^*$	2,145

* Significante

DISCUSSÃO

Os valores médios normais e os de hansenianos, das imunoglobulinas, encontrados por diversos autores, situam-se dentro de uma larga faixa, em virtude da variação na metodologia de trabalho, padrões utilizados, fatores genéticos do indivíduo e fatores ambientais. Essa variação pode ser visualizada, em termos de interpretação e quantificação, nas Tabelas V e VI, que dão os resultados obtidos por vários Autores.

Na quantificação de imunoglobulinas em indivíduos normais encontramos valores médios próximos aos de Pereira *et al.* (9), considerando-se a variação esperada pela diferente metodologia de trabalho, à exceção da IgM (Tabela I).

A mediana encontrada para os valores de IgD nesses indivíduos (3,1 mg/100 ml) é praticamente superponível ao valor médio determinado por Rowe *et al.* (10) para indivíduos normais (3 mg/100 ml). Damos os resultados das quantificações de IgD em mediana, por acharmos que esta representa melhor as características dos níveis dessa imunoglobulina. NI-

veis de IgD iguais a zero nem sempre indicam ausência total da mesma, podendo antes representar níveis muito baixos, não detectados pela concentração do anti-soro na placa.

Quando comparamos as quantificações obtidas em soros normais com aquelas dos soros de hansenianos (Tabela II) verificamos o aumento de IgG em todos os grupos, o de IgA nos grupos virchovianos e o de IgM apenas no grupo virchoviano Rubino positivo, estando normal a IgD em todos eles.

As observações quanto aos grupos Rubino positivo e Rubino negativos coincidiram com os dados obtidos por Sheagren *et al.* (13) e Jha *et al.* (5) (Tabela V), em pacientes virchovianos e tuberculóides.

O aumento de IgM observado no grupo virchoviano Rubino positivo já fora mencionado por outros Autores (2, 17), em pacientes virchovianos.

Nossos dados discordaram dos de Rowe *et al.* (10) quanto à IgD que, segundo eles, estaria aumentada na hanseníase. Talvez a pequena amostra com que trabalharam (5 pacientes), não possa espelhar realmente a situação.

T A B E L A V

Quantificação das Imunoglobulinas por Imunodifusão Radial
 Interpretação por vários autores dos níveis de imunoglobulinas encontrados em soro de hansenianos

AUTORES	ANO	MATERIAL	Tipo doença	PACIENTES		IMUNOGLOBULINAS			
				N.º	Tratamento	G	A	M	D
McKelvey & Fahey ⁷	1965	Próprio	—	3	—	↑↑	↑	N	—
Lim & Fusaro ⁸	1968	Próprio	V*	81	não	↑↑↑	N	↑↑	—
Rowe et al. ¹⁰	1968	Próprio	T	83	não	↑↑	↑↑	N	—
Tamblyn & Hokama ⁹	1969	Comercial	—	6	—	—	—	—	↑↑
Sheagren et al. ¹³	1969	Comercial	V	13	—	↓	N	↑↑↑	—
Bonomo et al. ¹	1969	Comercial	V	32	sulfona	↑↑↑	↑↑↑	N	—
Wemambu et al. ¹¹	1969	Comercial	V	82	—	↑↑	↑↑↑	N	—
Bullock et al. ²	1970	Comercial	T	26	—	N	N	N	—
Jha et al. ⁵	1971	Próprio	V	23	—	↑↑	↑↑↑	↑	—
Sagher et al. ¹²	1971	—	V	188	sim	↑↑	↑↑↑	N	—
			T	35	sim	N	N	N	—
			V	30	—	↑↑↑	↑↑↑	N	—
			V	8	—	↑↑	↑↑	N	—
			T	45	—	N	N	N	—
			T	6	—	N	N	N	—

* Significado das abreviações e representações gráficas: V = virchoviano; T = tuberculóide; N = normal; N̂ = normal ou ligeiramente aumentada; ↑ = ligeiramente aumentada; ↑↑ = aumento acentuado e ↓ = diminuída.

T A B E L A V I

Quantificação das Imunoglobulinas por imunodifusão radial
Resultados de vários autores e os da presente investigação

AUTORES	ORIGEM	MATERIAL	TRATAMENTO	TIPO DE HANSENIASE	G	A	M
					IMUNOGLOBULINAS mg/100 ml		
Lim & Fusaro (1968) (6)	Coréia	tubo próprio	não	V	2598	261	131
Tamblyn & Hokama (1968) (16)	Hawai	Hyland	—	T	2410 (2035)	286 (267)	95 (94)
Sheagren <i>et al.</i> (1969) (13)	Estados Unidos da América do Norte	Hyland	sim	V	1140	260	110
				V	1510 (850)	360 (180)	130 (130)
				V	2814	534	134
				V	1705	543	178
Bonomo <i>et al.</i> (1969) (1)	Índia	Hyland	—	{	1727	184	97
				T			
				V	5263	902	210
Wemambu <i>et al.</i> (1969) (17)	Malásia	Hyland	—	V	1084-4365 (800-1680)	204-1046 (140-480)	83-661 (50-190)
				V	2572	546	114
				T	2014 (2037)	306 (323)	84 (90)
Bullock <i>et al.</i> (1970) (2)	China	Hyland	sim	V	1435	276	123
Jha <i>et al.</i> (1971) (5)	Índia	—	—	T	970 (795)	167 (171)	120 (105)
Resultados obtidos nesta investigação (1972)	Brasil	Behringwerke	sim	VR+	2462	488	414
				VR-	2342	445	207
				TR-	1722 (1235)	317 (204)	149 (173)

Obs: Os números entre parênteses indicam médias ou valores — limites para soros de indivíduos normais.
Significado das abreviações: VR+ = virchoviano Rubino positivo; VR- = virchoviano Rubino negativo; TR- = tuberculóide Rubino negativo.

O aumento de IgG é um dado lógico, uma vez que esta se apresenta sempre elevada nas infecções prolongadas. O aumento de IgM, contudo, suscita opiniões diversas. Sheagren *et al.* (13) não têm qualquer explicação. Segundo Bonomo *et al.* (1), sendo a formação de IgM a resposta primária ao estímulo antigênico, poderia ocorrer que o *M. leprae* sofresse alterações antigênicas funcionando várias vezes como um novo antígeno. Para Lim & Fusaro (6), a possível explicação seria a contínua multiplicação do bacilo e a reação resultante do hospedeiro a essa grande população bacteriana.

Há necessidade ainda de maiores estudos sobre imunoglobulinas com a estrutura fundamental de IgM, porém, com baixo peso molecular (7 S) que compartilham determinantes antigênicos com a IgM 19 S, e que já foram observadas em virchovianos por Dammacco *et al.* (4). A presença de uma imunoglobulina com esse tipo de estrutura cujo baixo peso molecular permitiria maior difusão, aumentando a área de precipitação na quantificação, poderia explicar o aumento notável dessa imunoglobulina em determinados pacientes.

O aumento persistente de IgG e IgA em virchovianos, apesar da longa duração do tratamento, dever-se-ia, segundo Bullock *et al.* (2), à presença de bacilos mortos, mas ainda imunogênicos no organismo. Para Sagher *et al.* (12), a presença do bacilo da hanseníase em grande número, na mucosa, especialmente a nasal, produziria um forte estímulo antigênico, notadamente em estados reacionais, o que concorreria para o aumento observado na IgA.

Conforme assinalamos, verificamos níveis normais de IgD em todos os pacientes estudados. Essa imunoglobulina, descrita até o momento só em soros humanos, pouco conhecida em sua função biológica. Dados fragmentados mostram uma atividade imune de importância difícil de precisar.

Comprovamos a existência de diferença significativa entre os grupos para as imunoglobulinas G, A e M (tabelas II e III), sendo interessante notar-se o aumento gradual das imunoglobulinas tanto em quantidade como em inclusão de classes, partindo do grupo tuberculóide Rubino negativo, até o grupo virchoviano Rubino positivo (no grupo tuberculóide, aumento de IgG; no grupo virchoviano Rubino negativo, aumento de IgG e IgA e no grupo virchoviano Rubino positivo, aumento de IgG, IgA e IgM).

Embora Wemambu *et al.* (17) e Bullock *et al.* (2) não encontrassem diferença no nível de imunoglobulinas entre virchovianos com e sem reação, Sagher *et al.* (12) mencionaram o aumento de IgA nos estados reacionais. Para verificar se a presença de indivíduos reacionais poderia estar causando heterogeneidade dentro dos grupos virchovianos, fizemos a comparação entre eles e os não reacionais, tendo observado homogeneidade de comportamento.

A correlação que procuramos estabelecer entre os resultados da quantificação da IgG e a fração gama eletroforética visou confirmar os resultados de Claman & Merrill (3), os quais, utilizando método de quantificação em tubo, observaram que o método eletroforético era um bom meio de triagem com relação aos níveis de IgG

Estudo imunológico na hanseníase (II)

detectados pela imunodifusão. Podemos confirmar a altíssima correlação entre os dois dados para todos os grupos (Tabela IV).

Pelos resultados obtidos, parece-nos que o grupo virchowiano

Rubino positivo ou é submetido a um maior estímulo antigênico, ou responde a um estímulo antigênico idêntico com maior intensidade que o grupo virchowiano Rubino negativo.

AGRADECIMENTOS

Ao Hospital "Lauro de Souza Lima", de Bauru, nas pessoas do seu Diretor, Dr. Oswaldo Cruz e Diretor Clínico, Dr. Diltor V. A. Opromolla, pela inestimável colaboração prestada na seleção dos pacientes.

SUMMARY

IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON LEPROSY. II. QUANTITATION OF THE SERUM IMMUNOGLOBULINS. TENTATIVE ASSOCIATION TO RUBINO'S REACTION

Sera from 60 virchowian patients of hanseniasis (30 Rubino-positive and 30 Rubino-negative) and 16 tuberculoid patients (Rubino-negative) were analysed through the quantitation of immunoglobulins by single radial immunodiffusion. There was an increase of the IgG and IgA levels in the two virchowian groups. The

levels of IgM were augmented only in Rubino-positive virchowians. The IgD levels were normal in the three groups. In the tuberculoid patients only in the IgG class was observed increase. It seems that the Rubino-positive group is probably more responsive or more stimulated by antigenic action than Rubino-negative group.

REFERÊNCIAS

1. BONOMO, L.; DAMMACCO, F.; GILLARDI, U. Hypergammaglobulinemia, secondary macroglobulinemia and paraproteinemia in leprosy. *Int. J. Leprosy*, 37(3):280-287, 1969.
2. BULLOCK JR., W. E.; HO, M. F.; CHEN, M. J. Studies of immune mechanisms in leprosy. II. Quantitative relationship of IgG, IgA and IgM immunoglobulins. *J. Lab. Clin. Med.*, 73(5):863-870, 1970.
3. CLAMAN, H. N. & MERRILL, D. Hypergammaglobulinemia; the role of the immunoglobulins (gamma G, gamma A, gamma M). *J. Allergy*, 36:463-471, 1965.
4. DAMMACCO, F.; GIUSTINO, V.; BONOMO, L. The occurrence of serum 75 IgM in diseases associated with immunoglobulin abnormalities. *Int. Arch. Allergy*, 38:618-626, 1970.
5. JHA, P.; BALAKRISHNAN, K.; TALWAR, G. P.; BHUTANI, L. K. Status of humoral immune responses in leprosy. *Int. J. Leprosy*, 33(1):14-19, 1971.
6. LIM, S. D. & FUSARO, R. M. Leprosy. IV. The quantitation of immune globulins (IgG, IgA and IgM) in leprosy sera. *Int. J. Leprosy*, 36(2):144-153, 1968.
7. MCKELVEY, E. M. & FAHEY, J. L. Immunoglobulin changes in disease: quantitation on the basis of heavy polypeptide chains, IgG (gamma G), IgA (gamma A), and IgM (gamma M), and of light polypeptide chains, type K (I) and type L (II). *J. Clin. Invest.*, 44:1778-1787, 1965.

8. MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 3:235-254, 1965.
9. PEREIRA, J. M. CALLADO, A. N. A.; CONSTÂNCIO, W. F.; LAJCHTER, D.; VIEIRA, A. A. Determinação quantitativa de imunoglobulinas (imunodifusão radial). *R. MM. Est. Guanab.*, 38(2) :153-161, 1971.
10. ROWE, D. S.; CRABBÉ, P. A.; TURNER, M. W. Immunoglobulin D in serum, body fluids and lymphoid tissues. *Clin. Exp. Immunol.*, 3:477-490, 1968.
11. RUBINO, M. C. Séro-diagnostic de la lèpre par l'agglutino-sedimentation des-globules de mouton formoles. *Ann. Inst. Pasteur*, 47:147-172, 1931.
12. SAGHER, F.; SHESKIN, J.; ZLOTNICK, A.; TURK, J. L. Complement and immunoglobulin determinations in leprosy and lepra reaction. *Int. J. Leprosy*, 39(2) :541-553, 1971.
13. SHEAGREN, J. N.; BLOCK, J. B.; TRAUTMAN, J. R.; WOLFF, S. M. Immunologic reactivity in patients with leprosy. *Ann. Intern. Med.*, 70: 295-302, 1969.
14. SIEGEL, S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York, McGraw-Hill, 1956. p.116, 184, 202.
15. SILVA, O. P.; FERRI, R. G.; MORAES, N.; MARQUES, A. L. V. Estudos imunoquímicos na hanseníase. I. Eletro e imoeletroforese das proteínas séricas. Tentativa de associação com a reação de Rubino. (No prelo)
16. TAMBLYN, E. & HOKAMA, Y. C-reactive protein, immunoglobulin and serum protein analyses of sera from cases of lepromatous leprosy and tuberculosis. *Int. J. Leprosy*, 37(1) :68-73, 1969.
17. WEMAMBU, S. N. C.; TURK, J. L.; WATERS, M. F. R.; REES, R. J. W. Erythema nodosum leprosum: a clinical manifestation of the Arthus phenomenon. *Lancet*, 2:933-935, 1969.

Recebido para publicação em 30 de agosto de 1975.