

A questão das prioridades em Hanseníase: LTT populacional, instrumento de diagnóstico precoce?

Aguinaldo Gonçalves* Júlia Ignes Salem** Iris Ferrari***

I – A BLASTOGÊNESE.

A blastogênese, LTT ou reação blastóide, uma adaptação da técnica de cultura de tecidos de linfócitos do sangue periférico para diagnóstico citogenético, descrita originalmente por MORHEAD et al., 1960, consiste na observação do processo de desdiferenciação blástica dos linfócitos T: desde que imunocompetentes, tais células, quando colocadas, "in vitro", frente a substâncias que as estimulam (como a fitohemaglutinina, PHA), passam a sintetizar DNA para se dividir em blastos, consistindo a técnica ou em observar o percentual de células que apresentam tal modificação morfológica, ou em registrar a intensidade de incor-

poração de precursores rádio-marcados. No entanto, se o interesse da investigação residir em medir a memória imunológica para com um determinado patógeno, este mesmo é utilizado como estimulante específico (DENARO, 1977).

Em termos de hanseníase, portanto, LTT com PHA discrimina resposta imune, e com extrato de *M. Leprae*, contacto prévio com o agente (a partir de ULRICH, 1977). Depreende-se, assim, que o linfócito, guardadas as devidas proporções, vem recebendo nova dimensão de importância, ao contrário do que se verificou até recentemente, quando a ênfase da biologia da inter-relação hópede-parasita na hanseníase residia sobretudo nos

*Diretor Nacional, Secretaria de Programas Especiais, Ministério da Saúde; Pesquisador Pós-doutoral, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, junto à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

**Chefe do Departamento de Hanseníase do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.

***Professora titular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

macrófagos (v.g. AVILA, 1977).

Frente a certa controvérsia que envolve o fenômeno de Mitsuda (v. g. MACKNESS, 1972), já desde a década de sessenta vem se acumulando uma série de dados a respeito, não de toda harmônica (AZULAY, 1978). Ainda assim, já está suficientemente bem estabelecido o perfil do comportamento das populações linfocitárias nas várias condições do agravo: o percentual de positividade é menor dos doentes virchowianos, intermediário nos dimorfos e mais elevado nos tuberculóides, de forma bastante próxima aos valores observados em elementos da população normal, que correspondem aos mais elevados (BALIÑA, 1977).

Tais resultados, segundo alguns estudiosos (v. g. JANEWAY et al., 1976) decorrem das diferentes condições dos lípedes bacilares envolvidos e, segundo outros, a exemplo do ocorrido na tuberculose, de um efeito inibidor dos linfócitos B (v. g. BONA et al., 1976 ou do fenômeno de compartimentalização dos linfócitos, (MCMURRAY, 1980). Em nosso meio, são bastante conhecidos os trabalhos de PAGNANO (1974) e de FOSS (1976).

Investigações a respeito já existem há algum tempo e vários aspectos interessantes têm sido surpreendidos. Um deles, inclusive, a questão das variações dos achados, segundo diferentes elementos da estrutura epidemiológica, seja em relação ao espaço ou às pessoas (v. g. BJUNE, 1979), bem como as condições nutricionais, no caso vitamina A e zinco, este já anteriormente conhecido com atuação semelhante em animais inferiores (HART, 1978).

Esta, no entanto, se constitui em apenas uma das contribuições na aplicação da blastogênese na hanseníase.

Foi através de seu emprego que GODAL & NEGASSI (1973) detectaram os princípios de sua doutrina da infecção subclínica, revolucionando, assim, o entendimento sanitário subjacente, dado que a fonte, que sempre fora tomada como importante elo na cadeia da transmissão, talvez o mais importante (v. g. REES e MEADE, 1974), frente a tão difusa infecção subclínica, reserva-se a papel secundário. Em decorrência, surgiram consequências positivas para o relacionamento médico-paciente, na medida em que o conhecimento deste fato deixa o primeiro mais à vontade quanto à confiabilidade neste, mesmo que negue contacto prévio com o doente. Como paciente virchowiano tratado apresenta um perfil de desdiferenciação que o individualiza do seu símile não submetido à terapêutica específica, esta prova também pode ser entendida como indicador de progresso terapêutico. Também esta técnica é conhecida no processo de formação de rosetas estáveis pelo linfócito T. (KATOH, 1977).

A aplicação da blastogênese na hanseníase como modelo experimental, visando a melhor conhecimento nosográfico do agravo, já oferece uma grande massa de informações provavelmente em decorrência de sua natureza estritamente polar. Para outras doenças em que esta característica não ocorre, os resultados não são tão promissores. Trata-se exatamente da tuberculose, cuja epidemiologia (SARTWELL, 1968) e patogênese (SKINNES, 1968) são muito semelhantes as da hanseníase, mas que não apresenta polarização, e sim, espectro nosográfico (BHATNAGAR, R. et al, 1977), ao contrário da hanseníase, cuja polaridade, doutrina desenvolvida por estudiosos brasileiros, é aceita inclusive por

aqueles autores. E também o caso do que se conhece na esquistossomose, onde não se tem conseguido correlação estatística com a intensidade da infecção, mesmo com preparados antigênicos diferentes, sendo a resposta individual muito variável (GOLLEY et. al, 1977), embora, mais recentemente, outros autores (v. g. OTTESEN, 1979) imputem tais variações a um fator de modulação da resposta do hospedeiro à infecção. Estudos a respeito com pacientes acometidos por leishmaniose estão também em curso (v. g. WILER et. al., 1979).

No entanto, nesta oportunidade, o destaque maior está em novo aspecto sanitário que surpreendemos na questão.

II – O DIAGNÓSTICO PRECOCE

Desde a descrição por LEAVELL & CLARK (1976) do modelo de história natural das doenças, e, subsequentemente, do modelo preventivista, higienistas, sanitaristas e autoridades da Medicina Preventiva têm reconhecido que as ações profiláticas de Saúde Coletiva apresentam uma relação inversa entre prioridade e nível de complexidade.

De fato, as medidas de prevenção primária (ainda que no estrito campo nosográfico) sempre têm ascendência sobre as de prevenção secundária e ambas sobre as terciárias. Assim, nos diversos passos da organização e administração sanitária, seja a nível de extensão de rede básica de prestação de serviços, ou em relação a procedimentos de investigação e pesquisa, medidas de proteção específica devem preceder e envolver maiores esforços do que as relacionadas à limitação sequelar.

Na hanseníase, no entanto, os procedimentos correntes mais racionais referem-se ao diagnóstico adequado e à reabilitação física, psíquica e social dos afetados. Trata-se, evidentemente, de medidas que precisam continuar a serem aprofundadas, visando, quando mais não fosse, ao próprio direito inalienável do doente enquanto pessoa humana. No entanto, procuram atingir a questão quando já se encontra instalada a doença.

III – A BLASTOGÊNESE, INSTRUMENTO DO DIAGNÓSTICO PRECOCE DA HANSENÍASE

Convencidos, portanto, da procedência e possibilidade de a blastogênese se constituir em instrumento de diagnóstico precoce da moléstia, empreendemos em Manaus (Am) estudo exploratório a respeito. Entre indivíduos clinicamente indenes à moléstia, surpreendemos aqueles com comportamento blastogênico compatível com o encontrado em doentes da forma virchowiana (SALEM, 1981).

Tal projeto continua em andamento, sendo, portanto, factível, à detecção de novos elementos com esta mesma condição. De qualquer sorte, estes já conhecidos continuam sendo acompanhados e sua evolução certamente trará dados importantes para a confirmação ou exclusão desta proposta.

A se confirmar a primeira alternativa, importantes mudanças adicionais poderão ser descortinadas no controle da doença, como, por exemplo, o papel sanitário do exame de comunicantes provavelmente deveria ser reavaliado, bem como a estratégia do despistamento pelo exame clínico em massa, mesmo em áreas de alta endemicidade.

IV – PERSPECTIVAS

Frente a estas possíveis revelações trazidas à hanseníase pela blastogênese, impõe-se a apreciação cautelosa da exatidão e adequação da técnica em si.

O avanço da tecnologia metodológica na área já é bastante notável, oferecendo promissoras perspectivas. Se o interesse residir, por exemplo, na profundidade e acurácia de trabalhos realizados em grandes laboratórios, a reação blastóide pode se beneficiar de recursos espectrofotométricos (v. g. SHU et al., 1978). No entanto, se o compromisso for com a extensão e abrangência da Saúde Pública, microtécnicas utilizando poucas gotas de sangue periférico de cada probando já foram exaustivamente testadas em animais experimentais (v. g. STEEL & CRASEY, 1976, ou LEE, 1977) e na espécie humana (v. g. CURTET & MEVEL, 1976), permitindo, assim, sua utilização, inclusive em crianças (v. g. BROWN, 1977). Práticos "Kits" podem ser usados com razoáveis resultados (v. g. NIKOLIC et al., 1977). Outros advogam o emprego da técnica com sangue total, apenas que mediante sucessivos testes de validação (HALL & CORDON, 1976). Procedimentos considerados bastante seguros contra contaminação das culturas também estão sendo desenvolvidos, (como o de MAURER et al., 1977), empregando tubos capilares com agar.

O avanço na investigação complementar da técnica continua sendo registrado, tanto a nível de procedimento laboratorial, por exemplo, pelo uso de unidades de leitura mais automatizadas (v. g. BURFORD MASON & GYTE, 1979), ou de procedimentos melhor discriminados (v. g. BARCLAY

& WHITTE, 1976), quanto em termos de análise estatística (v. g. HARINA, 1976 & DEI & URBANO, 1977).

O poder discriminatório da técnica é bastante notável. Investigando diferentes dermatofíceas humanas, por exemplo, SVEJGAARD et al., 1976, afirmam que estudos comparativos das respostas blásticas a diferentes extratos fúngicos indicam a existência de especificidade a nível não só de gênero, mas também de espécie.

No entanto, apesar de tão promissoras revelações, posturas acautelatórias são desejáveis. Fontes de variações não experimentais têm sido relatadas, de forma não de todo infrequente. Pode-se tratar de evolução habitual quanto à apreciação de uma determinada técnica à medida que gradualmente maior número de pesquisadores em variados locais a vão utilizando com diferentes sistemas biológicos. Assim, GRAYBILL e ALFORD (1976) relatam que em muitos indivíduos a blastogênese varia amplamente de mês a mês, sem causa aparente, por exemplo. FAN et al., 1977, referem as variações de percentuais de blastos com fatores como tabagismo, exercício físico, níveis séricos de esteróides e catecolaminas e alterações nos ciclos circadianos. ANTHONY & PANUSH, 1978, por seu lado, referem que concentrações terapêuticas de ácido acetilsalicílico inibiram fortemente "in vitro" e "in vivo" blastogêneses de linfócitos humanos, induzidas por mitógenos e antígenos.

Muitas questões ainda permanecem para serem aprofundadas, como a controversia ação do levamisole na blastogênese humana (LICHTENFELT et al., 1973). Em seus termos, os resultados inconsistentes obtidos por eles e outros investigadores podem re-

fletir a instabilidade de tal fármaco sob condições "in vitro" de cultura linfocitária.

Também como premunitor de acidentados medicamentosos por hipersensibilidade, *latu sensu* (v. g. MOURIRR et al., 1977) com vários medicamentos, ou com a penicilina em particular (KAPLANSKY et al., 1978), a técnica não se revelou instrumento adequado. Alterações associadas com anestesia e trauma cirúrgico são conhecidas, mas sem relação com a idade do probando, sexo ou duração da intervenção (SALO, 1978). Nesta linha de fatos, seus resultados sofrem variações mediante o uso de interferon (BRODEUR et al., 1977).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTHONY, C. R. e PANUSH, R. S. – Interaction of acetylsalicylic acid with normal human peripheral blood lymphocytes. *Clin. exp. Immunol.* 31: 482-489, 1978.
- AVILA, J. L. – Biología de la interrelación hésped-parasito en células infectadas. *OPAS, IV Seminario Panamericano sobre el control de la lepra*, 52 - 57, 1977.
- AZULAY, R. D. – 1978 – Hanseníase: da imunobiologia à imunopatologia. *Tese do Professor Titular, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro*, 1978.
- BALIÑA, L. M. – Clasificación de la lepra de acuerdo con los avances de la inmunología. *OPAS, IV Seminario Panamericano sobre el control de la lepra*, 45 - 49, 1977.
- BARCLAY, G.R. & WHITE, A.G. – Frozen Lymphocyte pools as technical and reference controls for lymphocyte transformation. *Tissue Antig.* 10. 278 - 286, 1976.
- BONA, C., AUDIBERT, F., JUY, D. & CHÉDID, L. – Cell suppression in PPD – induced blast specific response of human peripheral blood lymphocytes. *Clin. exp. Immunol.* 26: 258, 266, 1976.
- BHATNAGAR, R., MALAVIYA, A.N. & NARHATANIV S. – Spectrum of immune response abnormalities in different clinical forms of tuberculosis. *Amer Rev. Resp. Dis.*, 115: 207-212, 1977.
- BJUNE, G. BARNETSON, R. S. C., RIDLEY, D.S. & KRONVALL – Lymphocyte transformation test in leprosy: correlation of the response with inflammation of lesions. *Clin. exp. Immunol.* 25: 85 - 94, 1976.
- BJUNE, G. – In vitro lymphocyte stimulation in leprosy: simultaneous stimulation with Mycobacterium leprae and phytohaemagglutinin. *Clin. ex. Immunol.* 36: 479 - 487, 1979.
- BRODEUR, B.R., WEINSTEIN, Y. MELNON, K.L. & MERIGAN, C. – Inhibition de la blastogênese par l'interferon. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)* 128: 53 - 56, 1977.
- BROWN, J. – A micro-method for the study of in vitro lymphocytes transformation to specific antigens. *J. Immunol. Methods* 18: 17 - 32, 1977.
- BUFORD-MASON, A.P. & GYTE, G.M.L. – An alternative method of expressing results of lymphocyte transformation experiments. *J. Immunol Methods* 28: 391 - 394, 1979.
- COLLEY, D. G. COOK, J. A., FREEMAN, G. L., Jr. BARTHOLOMEW, R. K., & JORDAN, P. – Immune responses during human schistosomiasis mansoni. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 53: 420 - 433, 1977.
- CURTEC, C. & MEVEL, B.P.L. – Development of a short term assay for lymphoblastic transformation in man. *Biomed.* 24: 334-339, 1976.
- DAGAM, J., ESHEL, I., GAZIT, E., PLAWNER & SHOHAM, J. – A newly designed whole microplate automatic washer for lymphocyte stimulation assays. *J. Immunol. Meth.* 30: 97 - 103, 1979.

- DEI, R. & URBANO, P. – Biometrical implications of factorial experiments for the study of lymphocyte mitogenic response. *J. Immunol. Methods* 15: 169 - 181, 1977.
- DENARO, L. – Contribuição ao estudo dos linfomas malignos – transformação blástica e alterações citogenéticas de linfócitos normais expostos “in vitro” à ação de homogenizado de tecido linfóide de pacientes linfomatosos. *Tese de doutoramento*, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 1977.
- FAN, P. T., YU, D. T. Y., CLEMENTS, P. J., OPEIZ, G., GOLDBERG, L. & BLUESTONE, R. - Daily variation in circulating lymphocyte counts, T and B proportions, and responsiveness to phytohemagglutinin. *Life Sci.* 21: 793 - 802, 1977.
- FOOS, N. T. – Transformação blástica de linfócitos cultivados “in vitro”, de doentes de lepra, comunicantes e não comunicantes, sob estímulo da fitohemaglutinina, lepromina e BCG, em meio de cultura com soro homólogo de indivíduo normal. *Tese de Mestrado*, à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1976.
- GODAL, T. & NEGASSI, K. – Subclinical infection in leprosy. *Brit Med. J* 3: 557 - 559, 1973.
- GRAYBILL, J.R. & ALFORD, R.H. – Variability of sequential studies of lymphocytes blastogenesis in normal adults. *Clin. exp. Immunol.* 25: 28 - 35, 1976.
- HALL, L.S. & GORDON, D.S. – Reproducibility, efficacy and methodology of mitogen-induced lymphocyte transformations by the blood assay. *J. Imm. Meth.* 12: 31 - 38, 1976.
- HARINA, B. M., GILL, T. J., RABIN, B. S. & TAYLOR, F.H. – A statistical analysis of human lymphocyte transformation data. *J. Immunogenetics* 6: 185 - 196, 1979.
- HART, D. A. – Effect of Zinc chloride on hamster lymphoid cells: mitogenicity and differential enhancement of lipopolysaccharide stimulation of lymphocytes. *Infect. and Immun.* 19 (2): 457 - 461, 1978.
- WILER, D.J. WEINBAUM, F.J. & HEROD, H. R. – Characterization of in vitro proliferative responses of human lymphocytes to leishmanial antigens. *The J. Infect. Diseases* 140 (2): 215 - 221, 1979.
- JANEWAY, C. A. Jr., MAURER, P. H., DAILEY, M.O. & INMAN, J. K. – The specificity of cellular immune responses in guinea pigs. *The J. Exper. Med.* 144: 1621 - 1640, 1976.
- KAPLANSKY, S., BONGRAD, P. & DEPIEDS, R. – Le test de transformation blastique peut-il contribuer à la prévision des accidents médicamenteux? *Nouv. Presse Méd.* 7 (24): 2181, 1978.
- KATOH, A.K. & CHAROENSIRI, S. – The formation of stable E-rosettes by human T lymphocytes activated by phytohemagglutinin. *The J. Immunol.* 118 (6): 2291-2292, 1977.
- LEE, L. F. – Chicken lymphocyte stimulation by mitogens: a microassay with whole blood cultures. *Avian dis* 22(2): 296, 307, 1977.
- LICHTENFELD, J. L., DESNER, M. R., WIERNIK, P.H. & MARDINEY, M. Jr. – Modulating effects of levamisole on human lymphocytes response in vitro. *Cancer Treat. Rep.* 60 (5): 571 - 574, 1976.
- MACKANESS, G. B. – Delayed hypersensitivity and its significance. *DHEWPUBL no.* (NH) 72: 68 - 89, 1972.
- MAURER, H. R., MASCHLER, R., DIETRICH, R. & GOEBEL, B. – In vitro culture of lymphocytes colonies in agar capillary tubes after pha-stimulation. *J. Immunol. Methods* 18: 353 - 364, 1977.
- MC MURRAY, D. N. – Mechanisms of anergy in tuberculosis. Editorial. *Chest*, 77 (1): 4 - 5, 1980.

- MOORHEAD, P., NOWELL, P. C. MELLMAN, W.J., BATTIPS, D.M. & HUNGERFORD, D. A. - Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cul. Res.* 20: 613 - 617, 1960.
- NIKOLIC, L., TOPUZ, U., PROEETTI - ORLANDI, F., RADUJKOV, Z. & ASTALDI, G. - With reference to a simple kit for short-term lymphocyte culture test in experimental animals. *Boll. Inst. Sieroter Milan* 55 (5): 400 - 410, 1976.
- OMS (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE) – *Comité de expertos da Organização Mundial da Saúde na Lepra. V. informe*, 1977.
- OTTESEN, E. A. – Modulation of the host response in human schistosomiasis. *The J. Immunol.* 123 (4): 1639 - 1644, 1979.
- PAGNANO, P. M. G. – Blastogênese de linfócitos de doentes de lepra, comunicantes e não comunicantes lepromino-positivos ou negativos, cultivados “in vitro” e estimulados pela fito-hemaglutinina, em meios com soro heterólogo, plasma autólogo ou plasma homólogo. *Tese de doutoramento* livre à Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1976.
- PORRIER, M., ROISIN, J.P. & COUTY, M.C. – Le test de transformation lymphoblastique pour le diagnostic des intolérances médicamenteuses. *Ann. Méd. Interne* 5: 461 - 465, 1977.
- REES, J.W. & MEADE, T.W. – Comparison of the modes and incidence of tuberculosis and leprosy *Lancet* 1: 47 - 48, 1974.
- SALO, M. – Effect of anaesthesia and surgery on the number of and mitogen-induced transformation of T - and B - lymphocytes. *Ann. Clin. Res.* 10: 1 - 13, 1976.
- SARTWELL, P. E. – Comparative epidemiology of leprosy and tuberculosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 154: 32 - 40, 1968.
- SCHU, S., CIMINO, E. F. & MARDINEY, M. L., Jr. – Light transmission analysis of lymphocyte activation by mitogens: a new technique. *J. Immun. Methods* 22: 219 - 232, 1978.
- SALEM, J. I – Blastogênese em hanseníase no Estado do Amazonas. *Tese de mestrado*, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade Federal do Amazonas, 1981.
- SKINSNES, O. N. Comparative pathogenesis of mycobacterioses. *Ann. N. Y. Acad. Sci* 154: 19 - 31, 1968.
- STEEL, C.M. & CREASEY, G.H. – A micro-method for the activation of human blood lymphocytes in vitro. *Immunol Commun* 5 (7-8): 669 - 684, 1976.
- SVEJGAARD, E., THOMSEN, M., MORLING, N. & CRISTIANSEN, A. H. – Lymphocyte transformation in vitro in dermatophytosis. *Actapath microbiol scand Sec. C.* 84: 511 - 519, 1976.
- ULRICH, M. – La fonction de los linfócitos en la inmunología de le lepra. *OPS, IV Seminario panamericano sobre el control de la lepra*, 49 - 51, 1977.
- VOSSA, J. A., BEIGUELMAN, B., PISANI, R.C.B. & CESAR, P.C. – Transformação dos linfócitos induzido pela fitohemaglutinina e reação de Mitsuda. *Hansen int.* 2 (1): 53 - 59, 1977.