

# PESQUISA DO NÚMERO DE CÉLULAS TIMO DEPENDENTES NO SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DE HANSENÍASE

Édimo Garcia de Lima\* - Luís Taneo Shimano\*  
Maria Aparecida de Araújo Arantes\*

---

## RESUMO

Para este estudo foram empregados números absolutos de células timo-dependentes da corrente circulatória de indivíduos portadores do mal de HANSEN, que procuravam cuidados médicos no Centro de Saúde de Ribeirão Preto, SP.

O grupo controle empregado neste trabalho foi composto de soldados com 19 anos de idade. O seu sangue foi hemolisado por choque hipotônico. Os leucócitos foram depois colocados em lâminas, fixados por acetona e corados por isotiocinato de fluoresceína.

Para a contagem das células utilizamos microscopia de fluorescência.

Os resultados analisados mostraram não haver correlação entre os números absolutos de células em relação ao sexo e a idade. Considerando os tempos de tratamento empregados em relação às diferentes formas da doença concluímos também não haver nenhuma influência sobre o número das células estudadas.

## INTRODUÇÃO

Alguns pesquisadores (1, 3, 5 e 7) investigaram a variação do número de linfócitos timo-derivados no sangue de doadores normais e de portadores de hanseníase. Encontraram uma queda no número deles e também no aumento relativo dos linfócitos do tipo B. Sugerem que este aumento seja devido a um estímulo daqueles linfócitos pela deficiência numérica e funcional dos linfócitos do tipo T em lepra lepromatosa. Tais aumentos poderiam também sugerir a possibilidade de uma anergia do sistema imu-

ne em portadores daquela forma polar de lepra, ou poderiam ser devidos à destruição dos linfócitos do tipo T ou, ainda, a um impedimento de sua recirculação. Encontraram valores normais em pacientes tratados e em portadores da forma tuberculóide.

No presente trabalho os autores determinaram o número das células timo-dependentes do sangue periférico em pacientes portadores de lepra lepromatosa, tuberculóide e indeterminada. Nesta determinação foi usada a reação de imunofluorescência indireta como fizeram RAMOT, et alii., 1973,

tendo em vista, também, os trabalhos de BOREK, 1961, e os de HENLE & HENLE, 1966, quando estudaram o linfoma de BURKITT, através da imunofluorescência indireta.

Os autores analisaram, ainda, as possíveis diferenças existentes entre os resultados apresentados em relação ao sexo, à idade, tempo de tratamento e às formas de lepra.

## MATERIAL E METODO

Foram utilizados na determinação das células timo-dependentes esfregaços de leucócitos provenientes do sangue de portadores de Hanseníase, nas formas lepromatosa, tuberculóide e indeterminada, com tempos variados de tratamento. Os doadores utilizados recebiam tratamento médico e cuidados de enfermagem no Centro de Saúde de Ribeirão Preto (DS-6). Como controle foram usados esfregaços de sangue colhido de soldados, recentemente incorporados ao Exército, com 19 anos de idade e selecionados por exames médicos.

A colheita de sangue dos doentes e do grupo controle foi feita por punção venosa, tendo sido utilizada a veia do antebraço, observando-se todos os cuidados de assepsia e antisepsia; 0,1 ml de uma solução de anticoagulante (11) foi empregada e os tubos deixados em geladeira a + 4°C, por 12 horas para completa estabilização.

Após este tempo, foram feitas contagens globais e específicas dos leucócitos, o material submetido ao choque hipotônico e, em seguida, lavado por três vezes em solução tamponada de fosfato (Phosphat buffer solution - PBS) isenta de Ca ++ e Mg. ++. Dos leucócitos obtidos dessa forma, foram preparados esfregaços em lâminas previamente tratadas com solução de

tergente e conservadas em álcool-éter a 50,0% secas em temperatura ambiente por 60 minutos e fixadas com acetona por duas vezes consecutivas durante 10 minutos.

As lâminas assim preparadas foram estocadas em caixas de madeira e conservadas a - 25°C, até o momento de sua coloração.

## PREPARO DO SORO ANTITIMO

Foram inoculados 10 coelhos com uma suspensão de timo humano de um natimorto. Depois de triturado foi obtida uma suspensão de timo relativamente espessa, que, passada em Eppendorf por 5 minutos, se tornava bastante fina.

Dependendo da fase de imunização, o animal recebia a suspensão emulsionada em adjuvante de FREUND ora completo, ora incompleto. Terminadas as inoculações os animais foram sangrados e o soro obtido foi absorvido.

## ABSORÇÃO

As absorções foram feitas com hemácias humanas e com pó de fígado humano, como preconizam SARKAR, et alii, 1973 e YAMANA, et alii, 1974. As hemácias foram lavadas em solução fosfatada, pH 7,4, por quatro vezes e juntadas aos soros na proporção de 2:3,2. Após agitação cuidadosa a mistura foi incubada a 37°C, por 60 minutos e centrifugada a 600 g, durante 20 minutos em temperatura ambiente (+ 22°C).

A absorção dos soros com o pó de fígado se processou nas mesmas condições, porém na proporção de 75 mg de pó para 1,0 ml de soro.

O pó de fígado foi preparado utilizando-se 300 g de fígado fresco, moído e filtrado em gaze. A pa-

pa obtida foi submetida ao choque hipotônico. Obteve-se uma suspensão celular, que foi triturada em Eppendorf. O material resultante foi tratado com éter sulfúrico por três vezes, sob agitação constante. A pasta resultante foi deixada secar a + 37°C, resultando daí um pó que foi conservado em geladeira a + 4°C.

## OBTENÇÃO E PREPARO DA IMUNOGLOBULINA ANTICOELHO

O soro antiglobulina foi preparado em cabra. Foi feita uma mistura de soros de coelho, emulsionada com adjuvante de FREUND completo e/ ou incompleto, na proporção de 1:3 e esta inoculada em cabra pelas vias: intramuscular e subcutânea. No fim da imunização a cabra foi sangrada e o soro separado.

A imunoglobulina foi precipitada pelo sulfato de amônio e levada por quatro vezes em solução de cloreto de sódio a 0,85%. E depois dializada contra solução de cloreto de sódio a 0,85% e, em seguida, contra solução fosfatada, pH 7,4, por mais cinco horas.

## CONJUGAÇÃO

Para a conjugação da imunoglobulina com o isotiocianato de fluoresceína levou-se em conta o seu teor protéico a fim de se obter proporcionalidade de isotiocianato de fluoresceína. A mistura globulina-isotiocianato foi agitada durante 16 horas a + 4°C e a seguir filtrada em sephadex G 25.

## COLORAÇÃO

Os esfregaços de leucócitos foram cobertos com soro de coelho

antitimo humano e incubados durante 60 minutos a 37°C. Em seguida lavados e cobertos com a globulina antioelho conjugada com isotiocianato de fluoresceína e novamente incubados (2, 4 e 9).

## LEITURA DOS ESFREGAÇOS

A leitura foi feita em microscópio ZEISS, aumento 400 X, lâmpada fluorescente OSRAN-HB0, 200 W.

As células foram contadas por duas pessoas; o critério adotado para fluorescência positiva foi aquele em que as células se apresentavam nitidamente fluorescentes em seu todo ou na periferia celular, e, para não fluorescentes, as que adquiriram uma coloração vermelha. Foram contadas 200 células em cada esfregaço, levando-se em consideração o número de células fluorescentes (timo-dependentes - TD) e não fluorescentes (NF).

Foram examinados sangues de 202 pessoas, sendo:

Sangue de	Total
Controles	078
Lepra lepromatosa - 106	106
Lepra tuberculóide - 011	011
Lepra indeterminada - 007	007
Total .	124 202

## RESULTADOS

Os doadores cujo sangue serviu como controle tinham a mesma idade. Já entre os doentes, a idade variou entre 10 e 87 anos, havendo maior incidência no grupo etário de 46 a 51 anos.

Tabela 1. - Distribuição dos grupos segundo a idade

Grupos em anos	Incidência
10 - 27	06
28 - 33	12
34 - 39	15
40 - 45	19
46 - 51	24
52 - 57	15
58 - 63	18
64 - 69	11
70 - 87	04
Total	124

Quanto ao tempo de tratamento os pacientes se distribuíram, segundo a tabela 2.

Tabela 2. — Distribuição dos grupos de doentes, segundo o tempo de tratamento.

Tempo de Tratamento (em anos)	Formas de hanseníase			
	Lepromatosa	Tuberculóide	Indeterminada	Total
0 - 6	30	05	04	39
7 - 12	18	02	—	20
13 - 18	19	01	02	22
19 - 24	15	02	—	17
25 - 30	13	01	—	14
31 - 36	07	—	01	08
37 - 54	04	—	—	04
Total	106	11	07	124

Tabela 3. — Grupo controle e grupo doente em relação às células timo-dependentes e não fluorescentes.

Células	Controle	Doente	t	GL	N	5%	Sig.
TD	78	124	0,6764	200	202	1,97	NS
NF	78	124	1,2892	200	202	1,97	NS

Legenda: t (teste de t); GL (graus de liberdade); N (número); Sig. (significância; TD (timo-dependente) e NF (Não fluorescentes).

As relações entre os intervalos de tempo de tratamento mostraram não haver diferenças significativas entre eles.

O estudo dos resultados, em relação ao sexo e idade, mostrou não haver diferenças significativas entre ambos.

A tabela 3, mostra a relação e significância entre os resultados apresentados pelos grupos estudados e as células timo-dependentes e células não fluorescentes.

Pelos resultados apresentados observa-se que não houve diferenças significativas entre o grupo doente e o grupo doente e o grupo controle, o mesmo acontecendo em relação às formas da doença.

## DISCUSSÃO

O método empregado na obtenção de leucócitos a partir do sangue periférico não alterou de modo algum o seu comportamento imunológico.

Os "soros hiperimunes", antitimos, foram obtidos segundo um esquema previamente estudado. Para as inoculações foi preparada uma suspensão de células tímicas segundo os métodos preconizados por BOBROVE, et alii, 1974. Foi realizada a remoção dos anticorpos inespecíficos dos soros obtidos, como fizeram SARKAR, et alii, 1978, e YAMANA, et alii, 1974.

Os dados encontrados em relação ao sexo, idade e formas de lepra, tanto para as células timo-dependentes como para as não fluorescentes, mostraram-se não significativos.

A relação entre as diferenças dos resultados apresentados pelas células timo-dependentes e não fluorescentes, estudadas, levando-se em conta o tempo de tratamento dos pacientes, para as formas de hanseníase, mostrou-se não significante em todos os grupos estudados para as células timo-dependentes e também para as não fluorescentes.

Não foram evidenciadas diferenças significativas quando foram relacionados os grupos de tratamento.

Não houve resultados significativos em relação aos grupos de idades, considerando o número absoluto das células timo-dependentes e mesmo das não fluorescentes. Esta relação não foi significante ao nível de 5,0%. Isto demonstrou que mesmo variando o tempo de tratamento não há interferência sobre o número absoluto das células timo-dependentes e não fluorescentes.

Não foram encontradas diferenças entre os valores apresentados pelas células timo-dependentes e não fluorescentes dos controles e também dos portadores de hanseníase. O mesmo foi verificado em relação aos números absolutos das células estudadas, em se considerando as formas da doença estudada.

## SUMMARY

In this work, absolute numbers of thymus cells dependent in circulation were determined in Hansen individuals, who looked for medical care in the Health Center of Ribeirão Preto.

As a control group, 19 years old soldiers were utilized.

The bloods were hemolysed by hypotonic shock. The leukocytes were smeared, fixed with acetone and stained with FITC.

The counts were done in fluorescent microscopy.

The results showed no correlation in regard to sex and age.

Considering time of treatment in regard to the different stages of sickness, no correlation was found.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração prestada pelo Sr. Sylvio Felisberti Filho e Srta. Maria de Lourdes Ançaloni pela colheita dos sangues usados neste trabalho. Ainda agradecem à Sra. Maria Aparecida Nonato Fernandes pelos trabalhos técnicos prestados.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BOBROVE, A.M.; STROBER, S.; HERZENBERG, L.A. & DePAMPHILIS, J.D. - Identification and quantification of thymus-derived

- lymphocytes in human peripheral blood. *J. Immunol.*, 112(2):520-527, 1974.
2. BOREK, F. - The fluorescent antibody method in medical and biological research. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 24(2):249-256, 1961.
  3. DWYER, J.M.; BULLOCK, W.E. & FIELDS, J.P. - Disturbance of the blood T:B lymphocyte ratio in lepromatous leprosy. *New Engl. J. Med.*, 288(20): 1036-1039, 1973.
  4. ENGLER, E.; URBANECK, D. & OLECHNOWYTZ, A.F. - Immunhistologische Untersuchungen bei Schweinepest. I. Methode zum Nachweis der Schweinepestvirus in Organmaterial experimentell infizierten Schweine mit der direkten Immunfluoreszenz unter Verwendung der Kontrastfärbung mit Evans blau. *Arch. Exp. Vet. Med.*, 24: 481-501, 1970.
  5. GAJL-PECZALSKA, K.J.; LIM, S.D.; JACOBSON, R.R. & GOOD, R.A.B-lymphocytes in lepromatous leprosy. *New Engl. J. Med.*, 288 (20): 1033-1035, 1973.
  6. HENLE, G. & HENLE, W. - Immunofluorescence in cells derived from Burkitt's lymphoma. *J. Bacteriol.*, 91 (3): 1248-1262, 1966.
  7. NATH, I.; CURTIS, J.; BHUTANI, L.K. & TALWAR, G.P. - Reduction of a subpopulation of lymphocytes in lepromatous leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 18: 81-87, 1974.
  8. RAMOT, B.; MANY, A.; BINIAMI-NOV, M. & AGHAI, E. - Thymus - derived lymphocyte (T-cell) depletion in Hodgkin's disease. *Israel J. Med. Sci.*, 9 (5): 657-659, 1973.
  9. SARKAR, S.; HYMAN, R.; MASUDA, T. & HERZENBERG, L.A. - A rabbit antiserum to a thymus extract specific for mouse thymus-derived cells. *J. Immunol.*, 110 (5): 1222-1232, 1973.
  10. TOLLE, A. & JAHNKE, H.D. - Die Stabilisierung von Blutproben und Ein Verfahren zur haematologischen Reihenuntersuchung auf Rinderleukose. *Zbl. Vet. Med., Reihe B*, 12: 210-219, 1965.
  11. YAMANA, S.; ROAD, R.S.D.; DAVIS, D. J. & NAIRN, R.C. - Antilymphocyte antibody purified by immunoabsorption and elution. *Clin. Exp. Immunol.*, 16: 367-374, 1974.