

Pesquisa do número de linfócitos B e T no sangue periférico de bovinos sadios, duvidosos e portadores de leucemia.*

Édimo Garcia de Lima ** & Maria Aparecida A. Arantes **

RESUMO

Foram contados os linfócitos dos tipo B e T de amostras de sangue da corrente circulatória de reses sadias e de portadoras de leucemia, usando-se o teste de rosetas. Foram examinadas 545 amostras de sangue de animais sadios e 117 de portadores de leucemia.

Verificou-se um aumento dos linfócitos do tipo B, no sangue dos animais sadios do primeiro ano de vida até o terceiro, evidenciando-se, a seguir, uma queda do número dos linfócitos, com o avançar da idade. O número dos linfócitos T apresentou uma concentração maior no primeiro ano de vida, para decrescer com a idade, com um número mínimo de 2925 células por mm^3 no grupo etário de 10-15 anos de idade dos animais sadios examinados.

Os resultados encontrados nos animais suspeitos e doentes de leucemia mostraram uma persistência de linfocitose característica da doença e também um aumento das duas subpopulações de linfócitos estudadas, sendo que os linfócitos do tipo T mostram-se aumentados uma vez e meia mais em relação aos linfócitos do tipo B.

INTRODUÇÃO

Os linfócitos são células de origem medular e de órgãos linfáticos (2) e perfazem um total de 30,0% do conjunto da população celular de mesma origem (5). Recebem suas diferenciações específicas no apêndice cecal e placas de Peyer, os linfócitos do tipo B e no timo os linfócitos do tipo T (1, 4, 9, 11). O

número dos linfócitos dos tipos B e T foram determinados por alguns autores (4, 6, 7, 8, 16) para o homem em 20,0 a 34,0%, para os linfócitos do tipo B e 52,0 a 81,0 % para os linfócitos do tipo T. Foram também fixados os números dos linfócitos B e T para o camundongo (12 e 13), respectivamente em 33,0 - 34,0 % e 68,0 - 75,0 %, e ainda 10,0 e 70,0 %.

* Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

** Prof. Assistente Doutor do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

A alteração do número dos linfócitos pode ser evidenciada em doentes, através dos seus sistemas linfáticos, tanto para linfócitos do tipo B, como para os do tipo T.

Há autores (10) que não acreditam que se possa fazer diagnóstico de doenças através da diferenciação destas células e, possivelmente, pouca significação possa apresentar.

Foi verificado que para o homem com leucemia linfática crônica, o percentual dos linfócitos do tipo B, na corrente circulatória, pode passar do normal de 20,0 - 30,0% para 80,0 - 90,0% (7, 10 e 16). Estes valores foram bastante diferentes para outros autores que encontraram de 4,0 a 13,0 % (4 e 8).

Wilson & Nossal (1971) não encontraram, em quatro pacientes com leucemia linfática aguda, uma só célula do tipo B, na corrente circulatória dos pacientes examinados.

Não encontramos na literatura ao nosso alcance qualquer referência feita a respeito do estudo da diferenciação dos linfócitos B e T, do sangue periférico de bovinos, como tentativa de diagnóstico diferencial entre animais sadios e aqueles suspeitos ou doentes de leucemia.

No presente trabalho foi realizada a contagem absoluta dos linfócitos B e T da corrente circulatória de reses de diferentes idades, incluindo sadios, duvidosos e doentes de leucemia, com a finalidade de tentar-se encontrar um novo método de diagnóstico para a leucemia bovina.

Na determinação dos linfócitos B e T usou-se o teste de rosetas.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizadas amostras de sangue de 662 reses da raça holandesa de idades variando entre 1 e 15 anos, controladas por exames hematológicos semanais.

Na colheita do sangue utilizou-se a solução de titriplex III (3), com anticoagulante e estabilizadora. Na determinação do número de leucócitos empregou-se a contagem eletrônica através do contador "Coulter Counter", modelo D. No teste de rosetas empregaram-se os leucócitos dos bovinos, juntamente com hemácias sensibilizadas tratadas por complemento (C₃), a nível sub-lítico, e soro fetal bovino. As amostras de sangue (10,0 ml) dos animais foram retiradas da veia jugular com auxílio de agulhas 20 x 40 mm, colocadas com solução de titriplex III (0,1 ml) e misturadas por agitação dos tubos. As amostras foram deixadas à temperatura de + 4° C, por 16 horas, e depois de realizadas as contagens globais e específicas dos leucócitos submetidas ao choque hipotônico. Os leucócitos foram lavados em solução fosfatada tamponada a pH 7,4 (PBS - Phosphat Buffer Solution) por quatro vezes e a seguir diluídos para conter 4.000 leucócitos por mm³.

À parte foram preparadas suspensões de hemácias de carneiro, lavadas em PBS, sensibilizadas com hemolisina específica e tratadas com complemento. As hemácias assim obtidas foram submetidas a uma diluição para conter 100.000 células por mm³. Foram misturados os leucócitos com as hemácias em volumes iguais e incubados a 37° C, por 90 minutos (4 e 6). A-

pós o período de incubação foram contados os linfócitos do tipo B.

Na determinação do número dos linfócitos do tipo T foram empregados os leucócitos dos animais, assim como hemácias de carneiro tratadas com soro fetal bovino. Após a incubação a + 4° C, por 16 horas, da mistura em partes iguais da suspensão dos leucócitos com a suspensão das hemácias, foram contados os linfócitos que apresentavam com rosetas formadas com as hemácias, os linfócitos do tipo T.

Foram, a seguir, realizados os cálculos dos valores absolutos dos linfócitos para cada tipo, em cada amostra de sangue examinada.

RESULTADOS

Com a finalidade de mostrar a diferença entre o número dos linfócitos B e T, de animais sadios e de doentes com leucemia, foram estudadas amostras de sangue de 545 animais sadios. Eram animais procedentes de diferentes rebanhos e de diversos grupos etários.

A observação do número absoluto dos linfócitos B, dos animais sadios, está representada na tabela 1 e gráfico 1 e do número absoluto dos linfócitos do tipo T, na tabela 2 e gráfico 2.

A análise de variância encontrada com o número dos linfócitos do tipo B, assim como linfócitos do tipo T, nos grupos de animais sadios, mostrou alta significância na dependência de idade. Nos gráficos 1 e 2, pode-se verificar uma queda do número dos linfócitos na dependência da idade.

Nos resultados para os linfócitos do tipo B, (tabela 1 e gráfico 1) observa-se o número de 740 células

/mm³ no primeiro ano de vida e queda gradativa para os grupos etários mais velhos até 410 células/mm³, para os animais entre 10 e 15 anos de idade.

Os resultados para os linfócitos do tipo T (tabela 2 e gráfico 2) corresponderam a 5850 células/mm³, no primeiro ano de vida, mostrando a seguir uma queda do número de linfócitos, nos grupos etários seguintes.

Observa-se nos resultados, tanto para os linfócitos do tipo B como para os do tipo T, uma variação do número deles em função da idade, que é mais acentuada para os linfócitos do tipo T.

Na determinação dos linfócitos B e T, da corrente circulatória de bovinos duvidosos, juntamente com doentes de leucemia, foram usados 117 animais, sendo 30 portadores de resultados duvidosos e 87 com resultados declaradamente positivos. O número dos linfócitos B e T computados, é o resultado da média de duas contagens para cada animal separadamente. Os animais com exames duvidosos e positivos pertencentes a diversas idades mostraram marcantes diferenças no total dos linfócitos por mm³.

O pequeno número dos extremos não influenciou, tanto na idade como no aumento do número de linfócitos, nos grupos em que foram divididos.

Os animais com exames duvidosos e positivos foram divididos em grupos segundo o número de linfócitos que apresentavam (Tabela 3 e Gráfico 3).

TABELA 1

Número absoluto de linfócitos do tipo B por mm^3 do sangue de animais sadios.

| Idade (anos) | No. de animais | Média (x) | (x) Estimada |
|--------------|----------------|-----------|--------------|
| 1 | 52 | 819 | 740 |
| 2 | 54 | 679 | 785 |
| 3 | 50 | 825 | 795 |
| 4 | 50 | 817 | 770 |
| 5 | 50 | 702 | 726 |
| 6 | 50 | 616 | 650 |
| 7 | 62 | 643 | 580 |
| 8 | 55 | 463 | 506 |
| 9 | 51 | 445 | 456 |
| 10 - 15 | 71 | 404 | 410 |

TABELA 2

Número absoluto de linfócitos do tipo T por mm^3 do sangue de animais sadios.

| Idade (anos) | No. de animais | Média (X) | (X) estimada |
|--------------|----------------|-----------|--------------|
| 1 | 52 | 5648 | 5850 |
| 2 | 54 | 5135 | 4800 |
| 3 | 50 | 3977 | 4150 |
| 4 | 50 | 3604 | 3700 |
| 5 | 50 | 3309 | 3400 |
| 6 | 50 | 3359 | 3200 |
| 7 | 62 | 3153 | 3100 |
| 8 | 55 | 3245 | 3000 |
| 9 | 51 | 2862 | 2950 |
| 10-15 | 71 | 2779 | 2925 |

DISCUSSÃO

A proposição principal deste trabalho é a determinação do número dos linfócitos do tipo B e do tipo T, da corrente circulatória de animais portadores de leucemia,

diagnosticados por exames hematológicos. Não encontramos na literatura a nós acessível, trabalhos que fizessem referência ao número de linfócitos dos tipos B e T por mm^3 de sangue de bovinos sadios e mesmo de doentes com leucemia, em

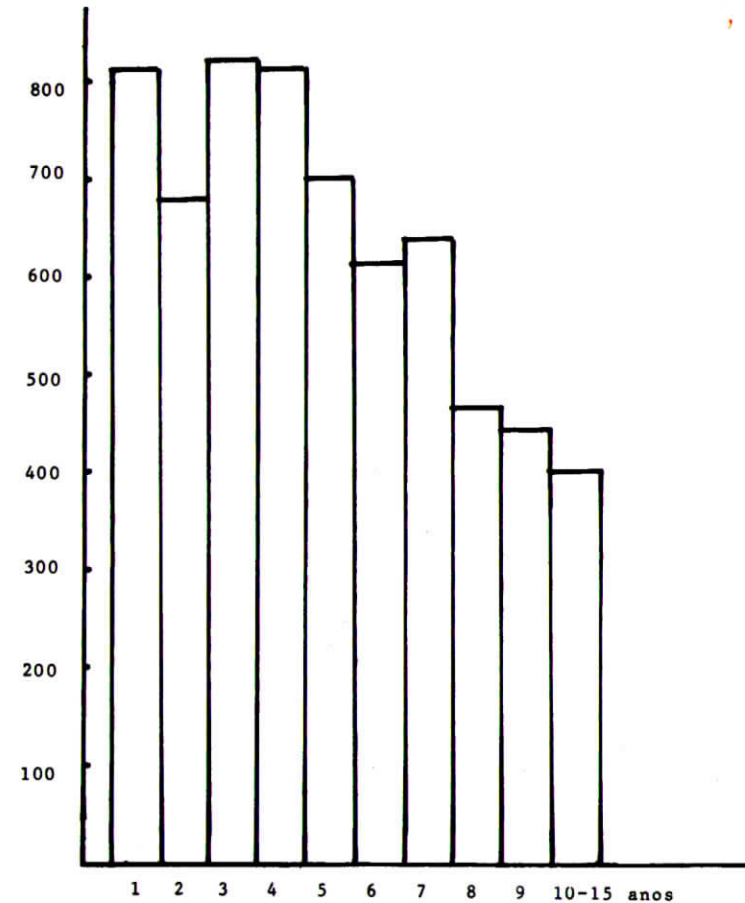


Gráfico 1 - Número absoluto de linfócitos do tipo B por mm^3

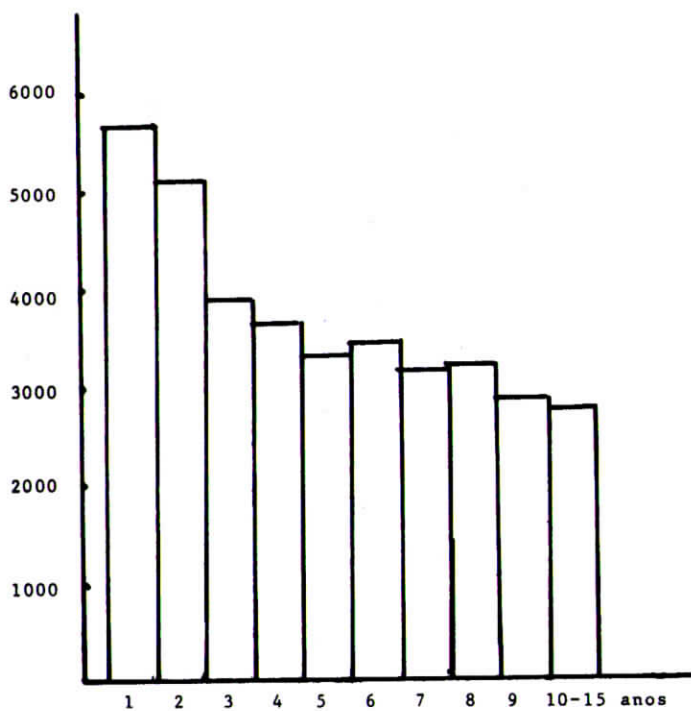


Gráfico 2 - Número absoluto de linfócitos do tipo T por mm³

TABELA 3

Número absoluto dos linfócitos B e T por mm^3 de animais duvidosos e portadores de leucemia.

| Grupos de animais | Animais com resultados duvidosos | resultados positivos | Média linfócitos/ mm^3 | Número de linfócitos tipo B S | em relação à idade linfócitos (\bar{x}) | tipo T S | |
|-------------------|----------------------------------|----------------------|---------------------------------|-------------------------------|---|----------|------|
| 1 | 11 | 2 | 7977 | 1,88 ± | 0,93 | 2,06 ± | 0,45 |
| 2 | 4 | 4 | 9551 | 2,00 ± | 0,64 | 2,42 ± | 0,31 |
| 3 | 3 | 5 | 10394 | 1,74 ± | 0,84 | 2,49 ± | 0,62 |
| 4 | 2 | 8 | 11391 | 2,67 ± | 1,59 | 2,90 ± | 0,49 |
| 5 | 7 | 6 | 12608 | 2,35 ± | 1,54 | 2,97 ± | 0,42 |
| 6 | 0 | 12 | 13459 | 3,28 ± | 1,85 | 3,38 ± | 0,68 |
| 7 | 1 | 11 | 15209 | 2,47 ± | 1,15 | 3,57 ± | 0,50 |
| 8 | 2 | 11 | 16780 | 2,49 ± | 1,46 | 3,90 ± | 0,58 |
| 9 | 0 | 12 | 18926 | 3,62 ± | 1,69 | 4,92 ± | 0,82 |
| 10 | 0 | 7 | 21098 | 3,79 ± | 2,53 | 5,73 ± | 0,82 |
| 11 | 0 | 9 | 37599 | 6,16 ± | 4,56 | 10,66 ± | 5,68 |

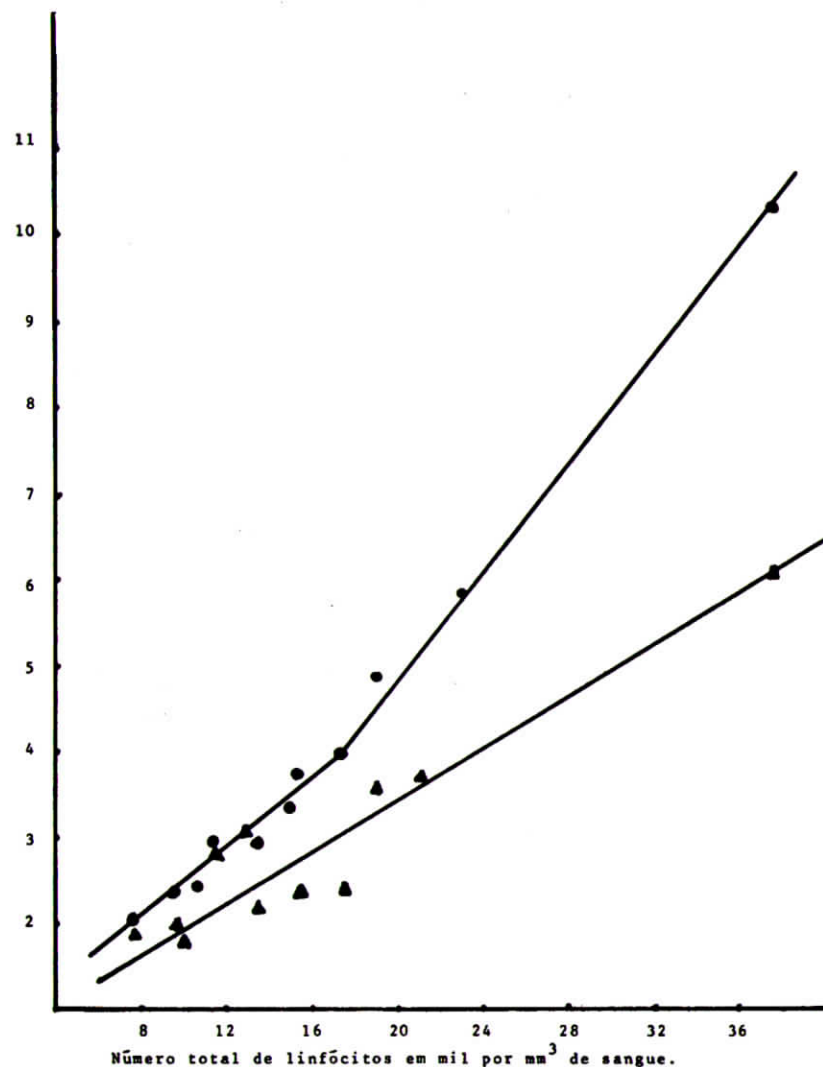


Gráfico 3 - Relação do número médio por mm^3 de linfócitos e médias dos linfócitos B e T

Legenda: ▲ linfócitos do tipo B
● linfócitos do tipo T

diferentes idades. Estes dados foram por nós determinados. Para isto foi necessário a introdução de uma técnica como o teste de rosetas, que nos fornecesse segurança na reprodutibilidade dos resultados. O teste usado é o de Huber & col. (1971) e de Jondal, Holm & Wigzell (1972) para determinar o número de linfócitos do tipo B, e o de Waller & MacLenman (1972), para os linfócitos do tipo T.

Foram determinados os números absolutos dos linfócitos B e T de 545 animais de rebanhos saudios, nos quais verificou-se um aumento do número dos linfócitos do tipo B, a partir do primeiro ano de vida dos animais até o terceiro ano, para depois decrescer até o grupo dos animais com 10 - 15 anos de idade.

O número dos linfócitos do tipo T, no primeiro ano de vida, apresentou uma média de 5.850 células por mm^3 de sangue como os linfócitos do tipo B, que também apresentaram queda com o avançar da idade dos animais.

No estudo das subpopulações dos linfócitos B e T nos animais portadores de leucemia foram computados os resultados dos exames de 117 animais, nos quais se pode verificar um aumento do número daqueles linfócitos, sendo que o número dos linfócitos do tipo T é maior uma vez e meia que o dos linfócitos do tipo B.

CONCLUSÕES

1 - Baseando-se nos resultados encontrados pode-se inferir que há uma elevação do número relativo dos linfócitos do tipo B e T, no sangue dos animais portadores de leu-

cemia em relação aos animais saudios.

2 - Pode-se verificar, ainda, que em relação ao aumento de ambas as subpopulações de linfócitos houve um aumento maior dos linfócitos do tipo T, na proporção de uma vez e meia.

SUMMARY

Lymphocytes type B and T were counted from blood samples of healthy and sick cows having leukaemia, using the rosette test. The sample consisted of 545 healthy and 117 sick animals.

It was found an increase of lymphocytes type B, in the healthy animals from the first to the third year of life and then a fall proportional to the age. As to the number of lymphocytes type T, the greatest concentration was found in the first year of age then decreasing. In the age-group 10-15 it was found a minimal number of 2925 cells per mm^3 .

In the sick animals, a characteristic persistent lymphocytosis was found and an increase of the two sub-populations of B and T lymphocytes, the type T showing an increase of one and a half more than type B.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 BURNET, F.M. - Immunological surveillance. Pergamon Press. Oxford, 1970.
- 2 FLIEDNER, T.M. - Lymphozyten = Lymphozyten?. Tagung Dtsch. Ges. Innere Med. Wiesbaden, 29. IV-3, V. 73, 1973.

3. GARCIA DE LIMA, E. & MITSCHERLICH, E. - Untersuchungen ueber die Zahl der B- und T-Lymphozyten in stroemenden Blut von gesunden, leukoseverdaechtigen und leukosekranken Rindern der Deustchen Schwarzbunten. Zbl. Vet. Med., B, 20:665-684, 1973.
- 4 HUBER, C.H.; ASAMER, H.; HUBER, H.; WIGZELL, H. & BRAUNSTEINER. - Zur funktionellen, Differenzierung lymphatischer Zellen: Lymphozyten mit Immunglobulin-determinanten und Bindungsfachigkeit fuer immunkomplexe bei der Maus. Zbl. Exp. Med., 156:34-51, 1971.
- 5 HUDSON, G.; OSMOND, D.G. & ROYLANCE, P.J. - Cell populations in the bone marrow of the normal guinea pig. Acta anat. Basel, 52:234-249, 1963.
- 6 JONDAL, M.; HOLM, G. & WIGZELL, H. - Surface markers on human T and B lymphocytes. J. Exp. Med., 136:207-215, 1972.
- 7 KOENIG, E.; COHNEN, G.; DOUGLAS, S.D. & BRITTINGER, G. - Frage der B-Zellen - Natur der CLL - Lymphozyten: In vitro-Untersuchungen mit Pokeweed Mitogen (PWM). 3. Arbeitstagung ueber Leukozytenkulturen, Tuebingen, 17-18, 18.3. 1972.
- 8 MICHELMAYER, G. & HUBER, H. - Receptor sites for complement on certain human peripheral blood lymphocytes. J. Immunol., 105:670-676, 1970.
- 9 MOORE, A.R. - Evidence for a primary association between immunoblasts and small gut. Nature, 239:161-162, 1972.
- 10 NOSSAL, G.J.V. - Immunologie und Krebs. Die gelben Hefte. Behring-Werke. Marburg. 12: 1-4, 1972.
- 11 OWEN, J.J.T. - The origins and development of lymphocyte populations. Ciba Foundation Sympos., Ontogeny of acquired immunity, 35-54, Elsevier Excerpta Medica, North-Holland.
- 12 RAFF, M.C. - The use of surface antigen markers to define different population of lymphocytes in the mouse. 3rd. Sigrid Juselius Sympos. Helsinki 83-90, Academic Press, London, New York, 1971.
- 13 RAFF, M.C.; NASE, S. & MITCHISON, N.A. - Mouse specific bone marrow derived lymphocyte antigen as a marker for thymus-independent lymphocytes. Nature, 230: 50-51, 1971.
- 14 YOFFEY, J. M. & COURTICE, F. C. - Lymphatics, lymph and the lympho-myeloid complex. Academic Press, London, New York., 1970.
- 15 WALLER, C.A. & MACLENMAN, I.C.M. - Analysis of lymphocytes in blood and tissues. Spontaneous sheep cell rosettes - in techniques in clinical immunology. Ed. Thompson, R.A. Blackwell Scientific Publications. 197.
- 16 WILSON, J.A. & NOSSAL, G.J.V. - Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and chronic lymphocytic leukaemia. Lancet, II: 788-791, 1971.