

## O TESTE DE INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS (T. M. L.)

### PRINCÍPIOS, REALIZAÇÕES E APLICAÇÕES CLÍNICAS\*

DANIEL CAMUS \*\* JOSÉ FERNANDO M. FIGUEIREDO \*\*\*

---

#### RESUMO

Os autores fizeram uma revisão bibliográfica sobre o teste de inibição da migração de leucócitos, ressaltando os fundamentos teóricos, a realização prática e as aplicações na clínica humana.

Define-se imunidade humoral como a intervenção de substâncias presentes nos humores do organismo, quer sejam elas específicas (anticorpos) ou não específicas (complemento, lisozima, interferon).

Inversamente, a imunidade celular se define pelos mecanismos imunitários provocados pelas células. Essa resposta pode ser não específica (fagocitose) ou específica (por ação das células imunologicamente competentes, os linfócitos).

O termo "imunidade celular específica" deve ser substituído pelo termo "imunidade por intervenção celular", pois também os

anticorpos têm uma origem celular.

O termo "imunidade por intervenção celular" não é usado apenas no sentido restrito de ação direta das células, mas admite igualmente os mediadores solúveis, secretados pelas células sensibilizadas, e que não são anticorpos.

Quanto à hipersensibilidade retardada (H.S.R.), ela está incluída nos fenômenos de resposta imunitária por intervenção celular, embora represente apenas uma das suas consequências.

A hipersensibilidade do tipo retardado, ou hipersensibilidade do tipo tuberculínico, foi descrita há mais de 75 anos e qualquer analista que lê uma reação intra-dérmica pela tuberculina conhece suas manifestações. O caráter imunológico da reação — diverso, pela sua qualidade específica, de um simples fenômeno inflamatório — e sua cronologia peculiar, que a diferencia de outros tipos de hipersensibilidade cutânea, fo-

---

\* Trabalho do Laboratório de Imunopatologia — Fundação Gonçalo Moniz — Salvador — BA-Brasil.

\*\* Técnico da "Coopération Technique Française" — Fundação Gonçalo Moniz.

\*\*\* Técnico Graduado e Diretor Executivo da Fundação Gonçalo Moniz.

ram reconhecidos desde o princípio do século.

Seu mecanismo, entretanto, ainda permanece obscuro. A ausência de um teste "in vitro", cujos fatores possam ser controlados e cujos efeitos medidos, retardaram seu estudo por longo tempo.

No decorrer destes últimos anos, surgiu um certo número de testes "in vitro" que abriram caminho para um estudo preciso e quantitativo dos mecanismos da H.S.R. Eles permitem a explicação dos fenômenos clínicos, tais como as doenças auto-imunes e as reações ao homo-enxerto.

Entre os "testes de H.S.R." aplicáveis em clínica humana, os mais conhecidos são o teste de inibição da migração dos leucócitos (TML) e o teste de transformação linfoblástica (TTL).

#### A — FUNDAMENTO TEÓRICO DA REAÇÃO

Em 1932, Rich e Lewis<sup>23</sup> notaram que uma migração celular se produzia em volta de fragmentos de órgãos linfóides em uma superfície plana num meio de cultura. Constataram, também, que se os fragmentos fossem provenientes de um animal que apresentasse uma HSR à tuberculina, a adição de tuberculina ao meio de cultura suprimia a migração celular. Para eles, a inibição da migração dos macrófagos era uma consequência dos "fenômenos de toxicidade" ao nível das células.

Foi necessário esperar-se os

trabalhos de Waksman<sup>29</sup>, em 1960, para saber que o fenômeno de inibição da migração das células não está relacionado a uma cito-toxicidade.

Em 1962, George e Vaughan<sup>14</sup> lançaram a sua técnica, utilizando tubos capilares, que possibilita uma medida da superfície de migração das células de exsudato peritoneal (linfócitos e macrófagos).

Sborg e Bendixen<sup>25</sup>, em 1967, propuseram uma variação deste teste de inibição da migração dos macrófagos, aplicável ao homem, o **Teste de Inibição da Migração dos Leucócitos** do sangue periférico humano (TML).

#### D) MECANISMO ÍNTIMO DA REAÇÃO

Pelos trabalhos de Bloom e Bennett<sup>2-4</sup>, David<sup>10</sup> e Dumondes<sup>12</sup>, o linfócito foi reconhecido como o elemento indispensável desta reação, a etapa essencial da qual é a ativação do mesmo<sup>21</sup>. Para explicar, dizemos que um linfócito, posto em contacto com um antígeno, conserva desse encontro uma certa lembrança: o linfócito fica "sensibilizado". Se esse linfócito "sensibilizado" é re-colocado em presença do antígeno que serviu de sensibilizador, ele vai "se ativar". Essa ativação será traduzida por um grande número de acontecimentos: informação dos plasmócitos, transformação linfoblástica, produção de "linfokinas", daí surgindo uma substância solúvel chamada MIF ("migration inhibitory factor") de David<sup>10</sup> e Bloom<sup>4</sup>.

É conhecido que o MIF tem a

propriedade fundamental de inibir a migração natural das células peritoneais normais. Parece certo que o MIF (ou uma substância semelhante) intervem também na inibição da migração dos

tes sistemas, confirmam o caráter específico da reação, tanto quanto o teste de HSR, pela correlação existente com os testes cutâneos lidos às 24 ou 48 horas e sua independência da presença de anti-

Linfócito sensibilizado +	→	M.I.F.	→	Inibição da migração dos leucócitos
Ag correspondente				

leucócitos do sangue periférico humano.

Podemos, portanto, esquematizar a sequência da reação da seguinte maneira:

Assim, os linfócitos sensibilizados, ativados pelo contato com o antígeno, sintetizam uma proteína, que inibe "in vitro" a migração dos leucócitos do sangue periférico.

Quanto ao mecanismo da reação, ainda não foi totalmente esclarecido. Supõe-se que a população mononuclear absorve o MIF em sua superfície, sem que, contudo, os mononucleares sejam alterados.

#### II) ESPECIFICIDADE DO TESTE

Os trabalhos de Sborg e Bendixen<sup>1,26,26</sup> mostram que a inibição da migração é específica do antígeno diante do qual o paciente apresenta uma HSR. Ainda mais, a especificidade antigênica da inibição é a mesma da reação cutânea retardada. Numerosos autores<sup>24,26,28,30</sup>, através de diferen-

corpos circulantes.

Existe, igualmente, uma especificidade na reação "in vivo". De fato, a inibição da migração e a reação cutânea de HSR só podem ser obtidas com o conjugado hapteno-proteína com o qual o paciente é sensibilizado. Esse caráter antigênico específico chama-se "carrier specificity".<sup>11</sup>

Enfim, o teste não explora a reação das células sensíveis ao antígeno, pois, sem a imunização prévia, a migração não é inibida. A mistura de duas populações linfocitárias alogênicas não produz inibição, uma vez que o sobrenadante de culturas mistas de linfócitos inibe a migração.

Convém lembrar que a inibição da migração não é específica do MIF. De fato, os complexos antígeno-anticorpos, as leucoaglutininas e as globulinas anti-linfocitárias podem igualmente inibir a migração. Veremos, contudo, que o protocolo operacional impede esta possibilidade (lavagem das células).

O teste da inibição da migração dos leucócitos pode, portanto, ser considerada como específico da HSR, muito embora nem todos os autores pensem assim<sup>8</sup>.

#### B — REALIZAÇÃO PRÁTICA DO TESTE

Descreveremos, a seguir, o método que utilizamos no Laboratório de Imuno-patologia da Fundação Gonçalo Moniz, inspirado diretamente no método de Sborg e Bendixen<sup>25</sup>:

O sangue é recolhido esterilmente sobre anti-coagulante (heparinato de cálcio, que não é tóxico para as células) em seringas tipo Plastipak-BD, na quantidade de 20 ml/grama de antígeno a testar. As seringas são colocadas a 37°C ou à temperatura ambiente, durante 60 a 90 minutos, inclinadas de 30 a 45°. Basta, portanto, pressionar o êmbolo da seringa, para recolher o material sobrenadante em tubos cônicos, estéreis e siliconizados.

Esses tubos servirão para lavar três vezes as células, em meio TC-199, por centrifugação de 1500 r.p.m., durante 10 minutos, de modo a separar o soro e, em consequência, os anticorpos que ele contém ou os complexos antígeno-anticorpo.

Entre a segunda e a terceira lavagens, realiza-se um choque hipotônico, a fim de se eliminarem os glóbulos vermelhos. Ao término da terceira lavagem, os leucócitos sedimentados são recolocados em TC-199 e a suspensão obtida é aspirada em tubos capi-

lares de silicone (comprimento de 70 mm com diâmetro interior de 0,5 mm). Os tubos capilares são vedados em uma extremidade por agar-gel e depois, por "mastique".

Eles são, então, submetidos a uma centrifugação de 1500 — 2000 r.p.m., durante 10 minutos. Os tubos são seccionados ao nível do limite entre os leucócitos e o sobrenadante. A parte contendo as células é colocada em câmara de Sykes-More, à razão de dois tubos por câmara, e mantida no lugar por graxa siliconizada neutra.

Enchem-se, então, as câmaras com meio de cultura HLEG (pH 6,8-7,2), com ou sem a adição dos antígenos e, em seguida, as mesmas são colocadas a 37°C durante 18 a 24 horas. Ao término dessa incubação, a superfície de migração pode ser desenhada pela utilização de um ampliador e depois medida por planimetria.

Os valores numéricos assim obtidos permitem o cálculo do índice de migração, MI:

$$MI = \frac{Mx}{Mo}$$

**Mx** = valor da migração em presença do antígeno = teste

**Mo** = valor da migração na ausência do antígeno = controle.

Insistimos sobre os seguintes pontos:

1 — necessidade de utilizar um material estéril;

2 — todo material em contato com as células deve ser siliconizado;

3 — os tubos capilares, todos do mesmo diâmetro, devem ser cortados com cuidado, da mesma maneira;

4 — as câmaras de cultura devem ser colocadas rigorosamente em posição horizontal;

5 — as diferentes soluções antigênicas devem ser realizadas em meio HLEG e o pH dessas soluções deve ser controlado;

6 — para cada antígeno, devem ser utilizadas doses diversas;

7 — é necessário conhecer-se a dose "tóxica" para cada antígeno.

8 — deve saber-se que existem variações da migração em função da concentração em antígeno do meio introduzido na câmara de cultura. Antes de atingir a dose "tóxica", o coeficiente MI é proporcional ao logaritmo da dose. Inversamente, com doses muito pequenas, pode ocorrer não mais a inibição da migração mas a estimulação da migração.

Não podemos encerrar este capítulo sem falar dos "testes similares" ao T.M.L.

Dois deles parecem-nos particularmente interessante:

1 — O TML em dois tempos (15,20), onde, no primeiro tempo, os linfócitos do paciente são colocados em cultura com ou sem antígeno. Os sobrenadantes acélulares dessas culturas são recuperados entre a 24<sup>a</sup> e a 48<sup>a</sup> horas e colocados, ou na presença de macrófagos de animais normais (20) ou sobre monócitos humanos normais (15). Uma

inibição da migração traduz aqui o efeito do MIF humano. De fato, o MIF não é específico de determinada espécie.

2 — O TML em ágar-gel, proposto por Clausen<sup>9</sup>, onde as células migram num gel de agarose enriquecido em meio de cultura.

#### C — APLICAÇÕES EM CLÍNICA HUMANA

O TML tem sido utilizado até agora em numerosos sistemas. Parece-nos, contudo, que ele se valorizou mais no sentido da auto-imunidade.

##### 1 — Doenças auto-imunes.

Convém aqui salientar os trabalhos das equipes de Copenhague e Paris<sup>17,18</sup> que possuem a experiência de 300 pacientes testados.

##### a) Afecções tireoidianas<sup>5,117,27</sup>

O antígeno utilizado é um extrato total da tireoide bovina liofilizada "Jean Roy" em doses de 3000 gama, 1000 gama, e 300 gama/ml ou o antígeno microsomial tireoidiano humano (Wellcome).

O teste é muito frequentemente positivo nas tireoidites do tipo Hashimoto e bastante frequentemente positivo no mixedema adquirido do adulto e na doença de Basedow. Notamos que, com os mesmos antígenos, resultados positivos são obtidos na anemia perniciosa de Biemer e nas aplasias suprarrenais.

O teste é negativo nos cânceres da tireoide, nos bóciros simples e nos hipo-paratireoidianos.

### b) Hipoparatiroidismos primitivos<sup>17</sup>

Utilizando-se um extrato salino da paratiroides de cadáver (1000 gama, 500 gama e 200 gama/ml), o teste parece específico do hipoparatiroidismo primitivo.

### c) Afecções corticossuprarrenais<sup>17,19</sup>

O antígeno utilizado é um extrato salino de suprarenal do macaco ou da suprarenal humana (1000 gama, 400 gama e 100 gama/ml).

O teste é positivo na doença de Addison, como também algumas vezes nas afecções tireoidianas e no hipoparatiroidismo.

### d) Doença de Biermer<sup>5,17</sup>

A utilização de um extrato liofilizado da mucosa gástrica de carneiro ("Lyocentre" 100mega/ml) faz com que se obtenham resultados positivos na doença de Biermer e nas afecções tireoidianas.

### e) Afecções cardíacas<sup>17</sup>

Um extrato salino de miocárdio 1000 gama, 400 gama e 100 gama/ml) fornece resultados interessantes nas afecções cardíacas de natureza supostamente imunitária (síndrome de Dressler, miocardites primitivas).

### f) Afecções pericárdicas<sup>17</sup>

Obtêm-se resultados positivos apenas nas pericardites idiopáticas

e na síndrome de Dressler em presença de antígeno pericárdico humano (100 gama, 500 gama, 2000 gama/ml).

### g) Lupus eritematoso disseminado<sup>17</sup>

Utilizamos, como a equipe de Moulias, um ADN altamente polimerizado de peixe (Laboratório Biostablix) nas doses de 50 gama, 100 gama e 200 gama/ml). Resultados positivos são obtidos no LED, assim como em outras afecções do colágeno.

### h) Detecção de processos autoimunitários em patologia hepática

Brostoff<sup>5</sup> já utilizou mitocôndrias no estudo das cirroses biliares primitivas. Nós usamos um antígeno total liofilizado de fígado humano, nas doses de 50 gama, 100 gama, 200 gama, e 1000 gama/ml.

### i) Detecção de processos autoimunitários em patologia renal

Inspirados nos trabalhos de Bendixen<sup>1</sup> sobre as glomerulonefrites proliferativas, utilizamos um antígeno total liofilizado de rim humano, nas doses de 50 gama, 100 gama, 200 gama, e 1000 gama/ml.

### j) Outros resultados

Resultados bem interessantes foram obtidos por numerosas equipes e citaremos, entre outros, o estudo da reto-colite hemorrági-

ca<sup>1,17</sup>, das dermatomiosites<sup>17</sup>, da esclerose em placa<sup>16</sup>.

Convém notar que existe um bom número de casos de reações cruzadas. Esse fenômeno pode ser atribuído às comunidades antigênicas mórbidas.

## 2 — DOENÇAS INFECCIOSAS

Os primeiros estudos do TML foram realizados por Sborg e Bendixon<sup>26</sup> em doentes com brucelose, com resultados positivos em 85% dos casos.

Bendixon e, depois dele, diversos autores, testaram a tuberculina entre pacientes tuberculosos ou vacinados pelo BCG.

Com pacientes que já tiveram parotidite contata-se uma inibição da migração em presença do antígeno da caxumba.

## 3 — DOENÇAS PARASITÁRIAS

Surge aqui primeiramente o problema da standardização dos antígenos. Daremos nossas técnicas, a título de informação.

### a) Esquistossomose

Wolfson e cols.<sup>30</sup> e Vernes e cols.<sup>28</sup> mostraram uma correlação entre TML e testes "in vitro" de HSR.

Vernes e cols. utilizam, como nós, um antígeno total a partir do adulto de *S. mansoni*, dosado em nitrogênio, na dose de 25 gama, 50 gama e 1000 gama/ml.

Capron e cols.<sup>7</sup> mostraram

também uma correlação entre testes de HSR e teste de letalidade sobre os esquistossômulos.

### b) Doença de Chagas

Yanovsky<sup>31</sup> e nós mesmos<sup>6</sup> notamos a grande frequência com que o teste nesta afecção apresenta os resultados positivos. Esses resultados parecem quasi sempre paralelos à análise sorológica.

Utilizamos um antígeno solúvel obtido por congelamento e descongelamento de culturas de *T. cruzi*, com a seguinte concentração: 33 gama prot./ml e 66 gama prot./ml.

### c) Toxoplasmose

Os resultados de Gaines<sup>13</sup> neste campo mostram todo o valor que se pode dar ao TML, realizado segundo a técnica de Clausen<sup>9</sup>.

## 4 — TRANSPLANTE

Nas pesquisas, o TML pode ser proposto para o estudo dos fenômenos de rejeição; nos trabalhos clínicos, ele poderia ser empregado para supervisão do processo de rejeição dos enxertos. Sabemos particularmente que o teste torna-se positivo 1 a 12 dias antes da rejeição do enxerto do rim humano, em presença do antígeno renal<sup>22</sup>.

O TML não pode jamais servir a uma prova de histocompatibilidade. De fato, duas populações celulares diferentes, colocadas num mesmo tubo capilar, migram normalmente (ao contrário do

que se passa no teste de transformação linfoblástica).

## 5 — ESTUDOS DOS IMUNODEPRESSORES

Os imunodepressores clínicos, em pequenas doses, facilitam a migração dos leucócitos.

As globulinas antilinfocitárias podem ora provocar uma inibição (se elas são fortemente aglutinantes), ora favorecer a migração (pe- las globulinas pouco aglutinantes). Muller Berrat<sup>18</sup> levantou a hipótese, nesse último caso, da diminuição da reação de HSR reação geralmente considerada como fundamental nos fenômenos de rejeição.

Observamos, enfim, que a cortisona inibe toda migração.

## 6 — PESQUISA DE ANTICORPOS

Embora considerada como específico da HSR o TML pode servir para a pesquisa de anticorpos ativos frente aos leucócitos<sup>18</sup>. Por um lado, as leucoaglutininas podem ser dosadas, diluindo-se o soro a estudar na suspensão celular. Por outro lado, os anticorpos anti-globulinas inibem a migração dos leucócitos de maneira proporcional a seu título.

## D — CONCLUSÃO

A descoberta de testes "in vitro", que permitem explorar a imunidade por mediação celular, abre novas perspectivas ao estudo da HSR do homem. Todavia,

se o valor destes testes é incontável, sua utilização prática só pode ser assegurada através de laboratórios especializados e treinados.

Compreende-se, portanto, que estes testes sejam reservados a certos domínios da fisiologia ou da patologia imunitária.

## SUMMARY

A review on the leucocyte migration inhibition tests is presented. Theory, techniques and clinical application are considered.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BENDIXEN, G. and SBORG, M. — *Danish Medical Bull.*, 16:1, 1969.
2. BLOOM, B.R. and BENNET, B. — *Fed. Proceed.*, 251, 1966.
3. BLOOM, B.R. and BENNET, B. — *Reticuloendothelial Society*, 3rd Ntl. Scient. Meeting, 366, 1966.
4. BLOOM, B.R. and BENNET, B. — *Science*, 153:80, 1966.
5. BROSTOF, J. — "Allergie et Immunologie", 1970.
6. CAMUS, D.; M. e FIGUEIREDO, J. F.M. — (Resultados não publicados).
7. CAPRON, A. CAPRON, M.; CAMUS, D. et VERNES, A. — *Path. Biol.*, 1973. (no prelo)
8. CLAUDY A.; THIVOLET, J.; VALANCOGNE, A. and SCHIMITT, D. — *Rev. Eur. Et. Clin. Biol.*, 16:826, 1971.
9. CLAUSEN, S.E. — *J. Immunol.*, 110: 546, 1973.
10. DAVID, J.R. — *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 56:72, 1966.
11. DAVID, J.R.; in P.A. MIESCHER and H. MULLER — "Textbook of Immunopathology", Eberhard, Ed., 1:111, 1969.
12. DUMONDES, D.C. — *But. Med. Bull.* 23:9, 1967.
13. GAINES, J.D.; ARAOJO, F.G.; KRAHENBUHL, J.L. and REMINGTON, J.; S. — *J. Immunol.*, 109:179, 1972.
14. GEORGE, M. and VAUGHAN, J.H. — *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 111:514, 1962.
15. GOLDBERG, L.S.; LOVIE, J.S. and BAKER, M.H. — *J. Immunol.*, 107:906, 1971.
16. LAMDUREUX: comunicação pessoal
17. MOULIAS, R.; GOUST, J.M.; DEVLIE; CHABROLIE, A.; BUFFET, C. and MULLER - BERAT, C.N. — *Presse Médicale*, 18:2315. 1970.

18. MULLER - BERAT, C.N. and MOULIAS, R. — *Presse Médicale*, 78:77, 1970.
19. NERUP, J.; ANDERSON, V. and BENDIXEN, G. — *Clin. Exp. Immunol.* 4:355, 1969.
20. RAJAPANSE, D.R. and GLYNN, L.E. — *Nature*, 26:857, 1970.
21. REVILLARD, J.P. — *Cah. Med. Lyon.*, 46:447, 1970.
22. REVILLARD, J.P. — "Journées Internationales de Transplantation, 1970".
23. RICH, A.R. and LEWIS, M.R. — *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 50:115, 1932.
24. ROSEMBERG, S.A. and DAVID, J.R. — *J. Immunol.*, 105:1447, 1970.
25. SBORG, M. — *Acta Med. Scand.*, 182: 167, 1967.
26. SBORG, M. and BENDIXEN, G. — *Acta Med. Scand.*, 181:247, 1969.
27. SBORG, M. and HACBERG, P. — *Acta Med. Scand.*, 185:221, 1969.
28. VERNES, A.; CAMUS, D.; CAPRON, M. and CAPRON, A. — *Path. Biol.* (no prelo) 1973.
29. WAKSMAN, B.H. — in "Cellular Aspects of Immunity", G.E.W. Wolstenholme e M.O. Connor, Ed., London, Churchill, 280, 1960.
30. WOLFSON, R.L.; MADDISSON, S.E. and KAGAN, J. — *Immunol.*, 109:123, 1973.
31. YANOVSKY, J.F. and ALBADO, E. — *J. Immunol.*, 109:1159, 1972.