

# "LINFÓCITOS T FORMADORES DE ROSÁCEA ESTÁVEL E NÍVEL DE RECEPTOR SOLÚVEL NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE LINFÓCITOS DE INDIVÍDUOS NORMAIS E DE PACIENTES URÊMICOS"<sup>a</sup>

EIKO NAKAGAWA ITANO<sup>b</sup>  
CLAUDETE SERRANO ASTOLFI FERREIRA<sup>b</sup>  
MYLENE MARI YOKOYAMA<sup>c</sup>  
ELZA MIDORI HASHIMOTO<sup>c</sup>  
SORAYA FERREIRA<sup>c</sup>  
ALTAIR JACOB MOCELIN<sup>d</sup>

## R E S U M O

Em pacientes urêmicos observamos diminuição do número de linfócitos T circulantes que formam rosácea estável a 37°C ( $0,26 \pm 0,1$  linf./ml), em relação ao grupo controle ( $0,42 \pm 0,3$  linf./ml). Tanto no grupo normal como de pacientes urêmicos, foi observado decréscimo significativo na porcentagem de dissociação de rosáceas a 37°C após a estimulação de linfócitos com PHA, em relação a linfócitos circulantes, porém não foi observada diferença entre os grupos. Embora seja citado aumento no nível de receptor solúvel para E (Rs) em soros de pacientes urêmicos, como confirmado pelos testes preliminares com soro anti-receptor, não foi observada diferença significativa entre o nível de Rs em sobrenadante de cultura de linfócitos estimulados entre o grupo normal ( $0,316 \pm 0,02$  mg/ml) e o grupo de pacientes urêmicos ( $0,288 \pm 0,03$  mg/ml). Esses resultados sugerem que o aumento no nível de Rs sérico em pacientes urêmicos, não se deve ao aumento de linfócitos T circulantes, formadores de rosácea estável, ou mesmo maior liberação de Rs pelos linfócitos estimulados, embora seja citado na literatura que os linfócitos estimulados, formadores de rosácea estável, liberem receptores.

**PALAVRAS-CHAVE:** Linfócito T; CD2.; Rosácea de linfócito T; Receptor solúvel para eritrócitos de carneiro; Uremia.

- a. Agradecemos ao Prod. José Vitor Jankevicius pelas valiosas sugestões. Apoio financeiro Coordenadoria de Pesquisa e Pós-Graduação/Universidade Estadual de Londrina (159.297/86) e CNPq (405485-84).  
b. Departamento de Patologia Geral – CCB/Universidade Estadual de Londrina.  
c. Ex-estagiários de Iniciação Científica (CNPq 106834/84 e 100535/84).  
d. Departamento de Clínica Médica – CCS/Universidade Estadual de Londrina.



## INTRODUÇÃO

Linfócitos T humanos interagem espontaneamente com eritrócitos de carneiro (E) através de estrutura CD2<sup>1</sup>, e o antígeno T11TS de superfície de E<sup>2</sup>, formando rosáceas.

As rosáceas de linfócitos T humanos normais obtidas a 4°C, quando aquecidas a 37°C, se dissociam formando "caps"<sup>3,4</sup>, através do movimento de receptores para E no plano de membrana plasmática de linfócito<sup>5</sup>. Já os timócitos humanos<sup>6,7</sup>, linfócitos estimulados com PHA<sup>8</sup>, linfócitos de pacientes com leucemia linfoblástica aguda<sup>9</sup> e de pacientes urêmicos transplantados com episódio de rejeição<sup>10</sup>, formam rosáceas estáveis a 37°C.

Além de membranas de linfócitos T humanos, os receptores podem ser detectados, sob forma solúvel, em sobrenadante de cultura de linfócitos estimulados<sup>11</sup> e em soros humanos normais<sup>12</sup>. Tem sido descrito a depressão da resposta imune celular em pacientes urêmicos<sup>13</sup>, e essa depressão possivelmente se deve a participação de fatores séricos<sup>14</sup>. Esses fatores poderão estar relacionados com os receptores para E, uma vez que tem sido descrito efeito imunossupressor de receptores solúveis para E presentes nos soros urêmicos<sup>15</sup>.

Os imunoblastos formam rosáceas estáveis a 37°C com E de múltiplas camadas<sup>16,17</sup>, sugerindo a liberação de receptores pelos imunoblastos e o nível de receptor solúvel está elevado em soros de pacientes com uremia<sup>18</sup>. Para tentar esclarecer esta questão, é nosso objetivo determinar o número absoluto de linfócitos T formadores de rosáceas E a 37°C, determinar a porcentagem de dissociação de rosáceas E a 37°C antes e após a cultura de linfócitos estimulados com PHA e verificar o nível de receptor solúvel no sobrenadante de cultura de linfócitos de indivíduos normais e de pacientes com uremia.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1 - Indivíduos estudados.

Pacientes urêmicos crônicos em hemodiálise, de ambos os sexos, com idade variando entre 20 a 50 anos. Indivíduos normais = alunos, funcionários e docentes da UEL, de ambos os sexos, com idade variando entre 20 a 50 anos.

### 2 - Preparação de soro de carneiro anti-Rs.

De acordo com MENDES e colaboradores<sup>19</sup>, com a imunização de carneiros com hemácias autólogas sensibilizadas com receptor solúvel humano.

### 3 - Separação de linfócitos.

Os linfócitos foram isolados a partir de sangue periférico heparinizado, separados em gradiente de Ficoll-Hypaque (D = 1.076).

### 4 - Teste de formação de rosácea entre linfócitos T humano e hemácias de carneiro.

Foi realizado de acordo com MENDES<sup>21</sup>. Para obten-

ção de rosáceas a 37°C, parte do material foi incubado por mais trinta minutos em banho maria a 37°C para verificar a dissociação.

### 5 - % de dissociação.

A determinação percentual de dissociação de rosácea a 37°C foi realizada através de seguinte cálculo:

$$\% \text{ de dissociação} = \left( \frac{\% \text{ Rosácea a } 4^{\circ}\text{C} - \% \text{ Rosácea a } 37^{\circ}\text{C}}{\% \text{ Rosácea a } 4^{\circ}\text{C}} \right) \times 100$$

### 6 - Cultura de linfócitos estimulados com PHA.

A partir de sangue periférico colhido assepticamente com heparina, as células mononucleares foram separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque e ajustadas para a concentração final de  $1 \times 10^6$  céls./ml. As culturas foram realizadas em meio RPMI, contendo penicilina, estreptomina e 20% de plasma autólogo inativado e absorvido com E e com e sem PHA. As culturas foram incubadas por 72 horas a 37°C em recipiente hermeticamente fechado, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Ao término da incubação, o sobrenadante foi separado e armazenado para dosagem do receptor solúvel e as células pós-cultura foram divididas em três porções: uma para realização de esfregaço, uma para teste de viabilidade das células e as células restantes foram utilizadas para o teste de formação de rosácea a 4°C e a 37°C (duplicata).

A porcentagem de transformação blástica foi verificada através da observação ao microscópio do esfregaço após coloração com Leishman, baseada em critérios morfológicos de identificação de células em transformação (duplicata).

### 7 - Dosagem de receptor solúvel.

O nível de receptor solúvel no sobrenadante de cultura de linfócitos, foi determinado através de imunoelctro-difusão, utilizando soro de carneiro anti-Rs, segundo MOURA<sup>18</sup>. Como padrão de concentração conhecida, foi utilizado Rs purificado (cromatografia por gel filtração e DEAE celulose) quantificado por Folin.

### 8 - Análise estatística.

A análise estatística foi realizada, utilizando-se o teste t de students.

## RESULTADOS

### 1 - Determinação de número absoluto de linfócitos T circulantes que formam rosáceas estáveis a 37°C, em grupo normal e urêmico.

A porcentagem de linfócitos que formam rosácea estável a 37°C, foi menor no grupo de pacientes urêmicos ( $0,42 \pm 0,3$  normal e  $0,26 \pm 0,1$  urêmico)  $p < 0,20$ . Tabela I.

### 2 - Análise de Rs presente em soro humano por difusão em gel.

Analisando 47 soros de pacientes urêmicos por imunodifusão (Ouchterlony-20) com soro anti-Rs, observa-



mos 25% de positividade. Por outro lado a análise de 15 amostras de soro humano normal não demonstraram linhas de precipitação.

**3 – Nível de receptor solúvel no sobrenadante de cultura de linfócitos humanos normais e de pacientes urêmicos, estimulados com PHA.**

O resultado obtido foi de:  $0,316 \pm 0,02$  mg/ml em grupo normal e  $0,288 \pm 0,03$  mg/ml em grupo de paciente. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos. Tabela II.

**4 – Determinação de tempo mínimo para a dissociação máxima de rosácea a 37°C.**

O tempo mínimo para dissociação máxima de rosáceas formadas a 4°C, quando incubado a 37°C, em cinco experimentos, foi de 30 minutos. Figura I.

**5 – Porcentagem de dissociação de rosácea a 37°C de linfócitos pré e pós-cultura (normais e pacientes urêmicos).**

A porcentagem de dissociação de linfócitos pré-cultura foi de  $66,8 \pm 22$  (normal) e  $65,6 \pm 19$  (paciente). Após a cultura de linfócitos com PHA houve decréscimo na porcentagem de dissociação para  $36,4 \pm 16$  (normal) e  $35,0 \pm 18$  (paciente).  $p \leq 0,05$ . Porém entre o grupo normal e paciente não observamos diferença significativa. Tabela III.

**6 – Porcentagem de transformação blástica de linfócitos, de indivíduos normais e de pacientes urêmicos, estimulados com PHA.**

Os resultados obtidos demonstraram uma porcentagem de transformação blástica de linfócitos ligeiramente menor no grupo de pacientes, em relação ao grupo controle, porém esta diferença não foi estatisticamente significativa. Tabela IV.

## DISCUSSÃO

Como a formação de rosácea é influenciada por diversos fatores, tais como: temperatura, tempo de incubação, proporção linfócito/E, velocidade de centrifugação, tratamento prévio de eritrócitos, adição de soro, etc., a porcentagem de rosácea tem variado muito na literatura, de acordo com a técnica empregada. Os nossos resultados de porcentagem de rosáceas totais (4°C) e o número de linfócitos circulantes, não demonstraram diferenças significativas entre os grupos normais e de pacientes com uremia. Estes resultados estão de acordo com SENGAR<sup>22</sup>.

Considerando que os pacientes urêmicos apresentam nível elevado de receptor solúvel para E no soro, e considerando que os imunoblastos formam rosáceas de múltiplas camadas de E, estáveis a 37°C, sugerindo secreção e liberação de receptores por estas células, estes pacientes poderiam apresentar um aumento do número de linfócitos que formam rosáceas estáveis. No entanto, observou-se em pacientes urêmicos linfócitos circulantes que formam rosá-

cea estável a 37°C, em menor número em relação ao grupo normal. Esse resultado sugere que o aumento no nível sérico de Rs não se deve ao aumento no número de linfócitos que liberam receptores. Por outro lado, existe a possibilidade de ter ocorrido esta liberação "in vivo", por alguma estimulação anterior, o que poderia explicar o número baixo de linfócitos T formadores de rosácea estável em pacientes urêmicos, pela perda de receptores de superfície de linfócito T.

Na literatura, tem sido relatado nível baixo de linfócitos circulantes que formam rosáceas estáveis em alguns pacientes com câncer, doenças autoimunes e infecções virais<sup>23</sup>, doenças onde a estimulação de linfócitos pode ter ocorrido previamente. Independentemente do aumento do número de células produtoras de receptores, o aumento no nível sérico poderia ocorrer por aumento na síntese e secreção de receptores solúveis.

Os linfócitos ativados, segundo RICHIE<sup>24</sup> convertem-se em células formadoras de rosácea estável em alguns minutos, precedendo o aparecimento de linfoblastos. É nesta fase que possivelmente os receptores são liberados para o meio de cultura.

Analisando a porcentagem de dissociação de rosácea a 37°C de linfócitos circulantes e pós-cultura, observou-se diminuição significativa após a estimulação de linfócitos com PHA, indicando aumento de linfócitos formadores de rosácea estável após a estimulação. Porém entre o grupo normal e de pacientes não se verificou diferença significativa. A dosagem de nível de Rs no sobrenadante dessas culturas, não demonstrou diferenças entre o grupo de indivíduos normais e o de pacientes. Essa não correlação entre o nível de Rs no soro e sobrenadante de cultura, com a quantidade similar de linfócitos formadores de rosácea estável, sugere que o aumento no nível de Rs no soro de pacientes urêmicos não é devido a maior liberação de Rs pelos linfócitos estimulados.

Os nossos resultados de dosagem de Rs em sobrenadante de cultura de linfócitos normais estimulados com PHA são similares aos de Oh(25) em cultura de  $10^7$  células. Considerando que a nossa cultura foi de  $10^6$  células, representa 10x mais receptor solúvel. Essa diferença possivelmente se deve ao reconhecimento mais amplo pelos anticorpos policlonais em relação ao anticorpo monoclonal utilizado por Oh(25). Mais recentemente, verificamos que o soro anti-Rs utilizado neste trabalho reconhece moléculas de aproximadamente 58 Kd, equivalente ao PM de CD2 e moléculas de peso molecular superior a 150 Kd, apresentando determinantes antigênicos em comum reconhecidos pelo soro anti-Rs<sup>26</sup>.

Neste trabalho, foi observado considerável estimulação em cultura de linfócitos sem PHA. Esta estimulação possivelmente tenha ocorrido devido a liberação de algum componente de E, durante a absorção de plasma autólogo. Essa absorção foi necessária para eliminar os Rs naturalmente presentes em plasma autólogos.

Para elucidar o mecanismo pelo qual ocorre o aumento no nível sérico de Rs em pacientes urêmicos, estudos adicionais são necessários.



TABELA I

Determinação de número absoluto de linfócitos T circulantes que formam rosáceas à 4°C e estáveis à 37°C, em grupo normal e paciente urêmico.

	Contagem global de leucócitos. ( X 10 <sup>6</sup> céls./ml)	% de Linfócitos	Nº absoluto de de linfócitos. ( X 10 <sup>6</sup> linf./ml)	Nº absoluto de de linfócitos (4°C) ( X 10 <sup>6</sup> linf./ml)	Nº absoluto de de linfócitos (37°C) ( X 10 <sup>6</sup> linf./ml)
Normal (N) n = 10	5,91 ± 1,8	37,33 ± 11,0	2,09 ± 0,5	1,25 ± 0,4	0,42 ± 0,35
Paciente (P) n = 12	5,57 ± 2,1	32,30 ± 11,1	1,76 ± 1,0	0,97 ± 0,5	0,26 ± 0,1

- Rosácea 4°C - NXP p > 0,20  
- Rosácea 37°C - NXP p < 0,20

TABELA II

Nível de Rs no sobrenadante de cultura de linfócitos humanos normais e de pacientes urêmicos.

	Nível de Rs em mg/ml	
	Normal (N)	Paciente (P)
com PHA	0,316 ± 0,027 n = 9	0,288 ± 0,31 n = 10
sem PHA	0,270 ± 0,040 n = 8	0,277 ± 0,032 n = 10

N X P p > 0,05  
Com PHA X Sem PHA p > 0,05

TABELA III

% de Dissociação de Rosácea a 37°C em grupo normal e urêmico.

Grupos	% Dissociação	
	Normal (N)	Paciente (P)
Pré-cultura	66,88 ± 22,06	65,64 ± 19,62
Pós-Cultura	C/PHA	36,42 ± 16,73
	S/PHA	57,12 ± 17,38

Pré-cultura X Pós-cultura (C/PHA) (N e P) p ≤ 0,05  
Paciente X Normal p > 0,05

TABELA IV

% de Transformação blástica de linfócitos humanos normais e de pacientes urêmicos, estimulados com PHA

Grupos	% Transformação blástica	
	Normal (N)	Paciente (P)
com PHA	86,34 ± 7,34 n = 8	80,08 ± 8,44 n = 8
Sem PHA	61,86 ± 17,81 n = 8	64,72 ± 15,78 n = 8

N X P p > 0,05

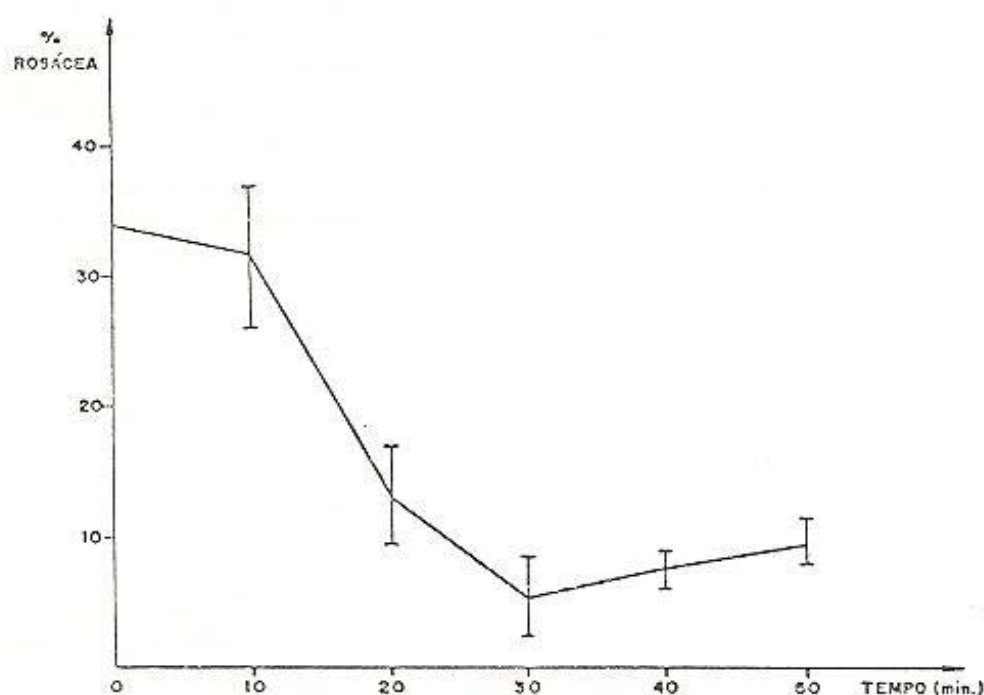


Fig. 1 - Cinética de dissociação de rosáceas E à 37°C, de linfócitos T periféricos humanos normais que formam rosáceas à 4°C.

#### A B S T R A C T

In uremic patients we found a decrease in the number of T lymphocytes able to form stable E rosettes at 37°C ( $0.26 \pm 0.1$  lymphocytes/ml), in relation to control group ( $0.42 \pm 0.3$  lymphocytes/ml); also a smaller percentage of E-rosette dissociation occurred in the stimulated cells of both control and uremic patients. As others we found an increased serum sheep erythrocyte (E) soluble receptor (Rs) level, but its quantification in the culture medium was not different in uremic or control PHA stimulated lymphocytes ( $0.316 \pm 0.02$  mg/ml versus  $0.288 \pm 0.03$  mg/ml). These results suggest that the increase in the level of seric Rs in uremic patients was not due to the increase in peripheral T lymphocytes capable of forming stable E rosettes, or by higher levels of Rs liberated by stimulated lymphocytes, although it is reported in the literature that stimulated lymphocytes, able to form stable E rosettes, liberate receptors.

**KEY WORDS:** T lymphocyte; CD2; E-Rosette; Soluble E-receptor; Uremia.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - MEUER, S.C.; HUSSEY, R.E.; FABBI, M.; FOX, D.; ACUTO, O.; FITGERALD, K.A.; HODGDON, J.C.; PROTENTIS, J.P.; SCHLOSSMAN, S.F. & REINHERZ, E.L. An alternative pathway of T cell activation; a functional role for the 50 Kd T11 sheep erythrocyte receptor protein. *Cell*, 36: 897-906, 1984.
- 2 - HUNIG, T.; MITNACHT, R.; TIEFENTHALER, G.; KOHLER, C. & MIYASAKA, M. T11TS the cell surface molecule binding to the "erythrocyte receptor" of T lymphocytes cellular distribution, purification to homogeneity and biochemical properties. *Eur. J. Immunol*, 16(2): 1615-1621, 1986.
- 3 - YU, D.T.Y. Human lymphocyte receptor movement induced by sheep erythrocyte binding: effect of temperature and neuraminidase treatment. *Cell. Immunol*, 14: 313-320, 1974.
- 4 - COHNEN, G. & BRITTINGER, G. Studies on human T lymphocyte rosette formation with human and sheep erythrocytes. *Res. Exp. Med.*, 166: 1-13, 1975.
- 5 - COHNEN, G. Distribution of erythrocyte receptors at the surface membrane of human T-lymphocytes. *Biomedicine*, 25: 48-51, 1975.
- 6 - MENDES, N.F.; TOLNAI, M.E.A.; SILVEIRA, N.P.A.; METZGAR, R.S. & GILBERTSEN, R. Technical aspects of rosettes tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte binding (T) lymphocytes. *J. Immunol.*, III: 860-867, 1973.
- 7 - GALILI, U. & SCHLESINGER, M. Studies on the formation of E-rosettes by human T lymphocytes and thymus cells. Effects of temperature, metabolic inhibitors and anti-T sera. *Isr. J. Med. Sci.*, II(12): 1357-1367, 1975.



- 8 – BERGER, B.M.; SCHUMAN, R.M.; DANIELE, R. & NOWELL, P.C. E rosette formation at 37°C: a property of mitogen – stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Cell. Immunol.*, 26: 105-113, 1976.
- 9 – BORELLA, L. & SEN, L. E-receptors on blasts from untreated acute lymphocytic leukemia (ALL): comparison of temperature dependence of E rosettes formed by normal and leukemic lymphoid cells. *J. Immunol.*, 114: 187-190, 1975.
- 10 – KUMAR, P.; LEECH, S.H.; BRYAN, C.F.; DUCOS, R.S. & MARKS, C. Thermostable erythrocytes rosettes in chronic renal failure and allograft rejection. *Am. J. Clin. Pathol.*, 80(6): 786-791, 1983.
- 11 – OWEN, F.L. & FANGER, M.W. Studies on the human T lymphocyte population. III. Synthesis and release of the lymphocyte receptor for sheep red blood cells by stimulated human T lymphoblasts. *J. Immunol.*, 115 (3): 765-770, 1975.
- 12 – MENDES, N.F.; SARAIVA, P.J. & SANTOS, O.B.O. Restorative effect of normal human serum, transfer factor and thymosin on the ability of heated human lymphocytes to form rosettes with sheep erythrocytes. *Cell. Immunol.*, 17: 560-566, 1975.
- 13 – HOLDSWORTH, B.R.; FILSGERALD, M.G.; HOSKING, C.S.; ATKINS, R.C. The effect of maintenance dialysis on lymphocyte function-Hemodialysis. *Clin. Exp. Immunol.*, 33: 95-101, 1978.
- 14 – NEWBERRY, W.M. and SANFORD, J.P. Defective cellular immunity in renal failure: depression of reactivity of lymphocytes to PHA by renal failure serum. *J. Clin. Invest.*, 50: 1261-1271, 1971.
- 15 – MUSATTI, C.C.; SOARES, V.A.; SANTOS, L.M.B.; De LIMA, J.J.G. & MENDES, N.F. Immunosuppressive effect of soluble E receptors in uremic serum. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 14: 403-410, 1979.
- 16 – MENDES, N.F.; ZENHA, M.J.; MUSATTI, C.C. & NASPITZ, C.K. Lymphocytes membrane receptors in cultures treated with mitogens. *Cell. Immunol.*, 12: 331-337, 1974.
- 17 – OH, S.K.; FARRAR, W.L. & RUSCETTI, F.W. Modulation of E receptor expression on activated T lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 38: 55-67, 1986.
- 18 – MOURA, N.C.; LONGO, I.M.; BERBD, L.A.G. & MENDES, N.F. Quantitation of the soluble receptor of human T lymphocytes for sheep erythrocytes by electroimmunodiffusion in the serum of patients with cancer, uremia and leprosy. *Experientia*, 39(3): 306-308, 1983.
- 19 – MENDES, N.F.; BERND, L.A.G.; CINTRA, H.H.A.; MENDES, C.M.F.; PRAÇA, C.L. & MOURA, N.C. Human T lymphocyte receptor for sheep erythrocytes: characterization of a specific antiserum and its application in the detection and quantitation of the receptor in a soluble form. *Cell. Immunol.*, 72: 143-150, 1982.
- 20 – OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prof. Allergy*, 5: 1, 1958.
- 21 – MENDES, N.F. Immunological identification of human lymphoid cell populations. *Lymphology*, 10: 85-93, 1975.
- 22 – SENGAR, D.P.; RASHID, A. & HARRIS, J.E. In vitro reactivity of lymphocytes obtained from uremic patients maintained by heamodialysis. *Clin. Exp. Immunol.*, 21(2): 298-305, 1975.
- 23 – WYBRAN, J. & FUNDENBERG, H.H. Thymus-derived rosette-forming cells in various human disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases. *J. Clin. Invest.*, 52: 1026-1032, 1973.
- 24 – RICHIE, E. & PATCHEN, M. Correlation between temperature-stable E-rosette formation and lymphocyte commitment to activation. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 11: 88-97, 1978.
- 25 – OH, S.K.; LAPENSON, D. & MORGAN, Jr. A.C. Quantification of soluble E-receptor in the serum of patients with various diseases and its accompanying in vitro immunosuppression in neoplasia. *Scand. J. Immunol.*, 22: 51-60, 1985.
- 26 – ITANO, E.N.; ONO, M.A.; SUMIGAWA, M.; LONGO, I.M.; MOURA, N.C. & MENDES, N.F. Molecular forms of soluble human T lymphocyte receptor for sheep erythrocytes in serum and saliva. *J. Clin. Lab. Anal.* 5 (2), 1990 "in press".

Recebido para publicação em 17/4/90