

ESTUDO DE SUBPOPLAÇÕES LINFOCITÁRIAS DE BAÇO DE DOENTES COM DOENÇA DE HODGKIN

Benedita Rocha, G. Munn e Maria de Sousa

Memorial Sloan Kettering Cancer Center. New York. U.S.A. e Departamento de Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa.

RESUMO

Estudaram-se as populações linfocitárias em baços de 5 doentes com doença de Hodgkin e num indivíduo normal. Nos baços patológicos observou-se um aumento do número de células *null* e uma diminuição da resposta ao mitogénio Concanavalina A, com manutenção da resposta à fitohemaglutinina. Por separação das células em gradientes de densidade isolou-se uma população celular incapaz de responder à Concanavalina A.

INTRODUÇÃO

Os doentes com D. de Hodgkin apresentam alterações da função imunológica que incluem incapacidade de rejeição de enxertos cutâneos, (Kelly et al 1960) anergia a testes cutâneos *in vitro* (Aisenberg 1962) e alterações da resposta *in vitro* dos linfócitos do sangue periférico a mitogénios T (Levy e Kaplan 1974). Estas alterações da função linfocitária têm sido atribuídos a uma anomalia intrínseca dos linfócitos T (de Sousa et al 1977, Dicke et al 1969, Dutton 1975) ou a alterações da circulação linfocitária com sequestro de linfócitos imunocomponentes nos órgãos envolvidos pela doença (de Sousa et al 1977). Para esclarecer o mecanismo etiopatogénico da alteração imunológica na D. de Hodgkin é portanto necessário o estudo da função T nos órgãos linfóides destes doentes.

No presente trabalho foram estudadas as populações linfocitárias de baço de 5 doentes com D. de Hodgkin tipo *Celularidade Mista*. Observou-se em todos os casos um aumento do número de células sem marcadores de superfície T ou B (*null cells*), uma diminuição acentuada da resposta à Concanavalina A, e manutenção da resposta a Fitohemaglutinina. Por separação das células de baço em gradientes de densidade, isolou-se nas fracções densas uma população celular incapaz de responder à Concanavalina A. A contribuição destes resultados para o esclarecimento do mecanismo etiopatogénico da doença de Hodgkin é discutida.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material biológico

Os baços humanos foram obtidos de 5 doentes, nos quais tinha sido feito o diagnóstico de Doença de Hodgkin tipo *Celularidade Mista*, segundo a modificação de Rye da classificação de Lukes e Butler (Lukes et al 1966) e que foram esplenectomizados para *staging*. Nenhum destes doentes tinha sido submetido a terapêutica prévia. No único doente no qual se observou envolvimento do baço pelo tumor, as suspensões celulares foram preparadas da porção do baço macroscopicamente não envolvida.

O baço humano usado como testemunho foi obtido de um indivíduo normal esplenectomizado por fractura de baço resultante dum acidente de viação.

Em qualquer dos casos, os estudos feitos foram executados nas primeiras 4 horas após a remoção do órgão, que foi mantido a 4°C em meio estéril, até à preparação das suspensões celulares.

Suspensões celulares e marcadores de superfície

As suspensões celulares foram preparadas por dissociação mecânica do órgão com duas agulhas em Minimum Essential Medium (MEM — GIBCO, USA). Os detritos celulares foram removidos por decantação e as suspensões lavadas duas vezes em MEM, antes de qualquer manipulação ulterior.

A separação de células com diferentes densidades fez-se em gradientes descontínuos de albumina (BSA-Bovine Serum Albumin Fraction V Sigma Chemical Co. ST Louis, Ms) segundo o método de Dicke et al (1969) como previamente descrevemos (Rocha et al 1979). Foram usadas soluções de BSA com diferentes densidades (31 %, 29 %, 27 %, 25 %, 23 %, 21 %, 19 %, e 17 % peso volume) preparadas a partir duma solução mãe com o pH 5.2 e a osmolaridade de 330 mOsm por diluição em tampão fosfato com 300 m Osm pH 7.2, de modo a obter as necessárias variações de osmolaridade no gradiente. Após centrifugação as células das diferentes interfases foram recolhidas com uma pipeta de Pasteur, e lavadas em grandes volumes de MEM.

O número de linfócitos T presentes nas suspensões celulares foi determinado pela sua capacidade de formarem rosetas espontâneas com glóbulos vermelhos de carneiro segundo o método de Jondal et al (1972). Foram considerados linfócitos B as células nas quais se detectou imunoglobulina de superfície por imunofluorescência directa usando um soro de coelho anti Ig humano conjugado com fluoresceína (Meloy, Behring).

Culturas celulares

As suspensões celulares, à concentração final de $2,5 \times 10^5$ cel./ml foram cultivadas em triplicado em placas de microcultura (0,2 ml/orifício) em RPMI 1640 (GIBCO, USA) com suplementos de 10 % de um pool de soro AB, glutamina (4×10^{-3} M, GIBCO, USA) Penicilina e Estreptomicina (100 U.I. GIBCO, USA) e tampão HEPES (2×10^{-2} M, GIBCO, USA). Os mitogénios, diluídos em 20 ml de RPMI foram juntos no início do período de incubação, que foi de 96 h a 37°C numa atmosfera húmida com 5 % de CO₂.

Para determinar a síntese de DNA, juntou-se à cultura durante as últimas 24 horas 0,1 μ Ci/cultura de ¹⁴C — timidina. Após o período de incubação, as células foram recolhidas em filtros de fibra de vidro por intermédio de um *Multisample cell harvester* (Titertek, U.K) e a quantidade de timidina Radioactiva incorporada determinou-se num contador de Radiações β (Tricarb, Packard, USA). Os resultados obtidos são exprimidos em CPM/cultura.

RESULTADOS

Caracterização da composição celular das suspensões celulares do baço.

Como se observa no Quadro 1, a percentagem de células T em baços de doentes com Doença de Hodgkin, não envolvidos pelo processo tumoral, encontra-se nos limites da normalidade, com diminuição constante da percentagem de células B. Observa-se

também em todos os casos um aumento do número de células sem marcadores T ou B i.e. das células *null*.

No doente n.º 3 cujo baço está envolvido pelo processo tumoral, as suspensões celulares são exclusivamente constituídas por células T (Quadro 1).

A separação de esplenocitos em gradientes de densidade não permite a separação das células T das células B (Quadro 2). No entanto há um enriquecimento de células T nas fracções 21/23 e 23/25, ao passo que as células B são mais abundantes nas fracções mais leves e mais densas (Quadro 2).

Quadro 1

Percentagem de células T e B em baços de doentes com doença de Hodgkin

Doente n.º	Sexo / Idade	Diagnóstico (a)	Envolvimento do baço (+/-)	% E	% Ig +
1	M 6	D.H.C.M.	(-)	26	3
2	M 11	D.H.C.M.	(-)	56	37
3	M 35	D.H.C.M.	(+)	75	2.5
4	M 42	D.H.C.M.	(-)	32	18
5	M 37	D.H.C.M.	(-)	27	24
6	M 18	T.AB.	—	34	48

(a) D.H.C.M. — Doença de Hodgkin tipo celularidade mista. T.AB. traumatismo abdominal. A percentagem de células T foi determinada pelo número de células capazes de formarem rosetas espontâneas com glóbulos vermelhos de carneiro e o número de células B como as células possuindo Ig de membrana (Ver Materiais e Métodos).

Quadro 2

Caracterização da composição das fracções celulares com diferentes densidades do baço de doentes com doença de Hodgkin

Fracção celular	% T					% B				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
17/19	—	10	31	17	10	—	27	12	18	27
19/21	—	18	30	15	7	—	47	4	39	41
21/23	—	56	59	49	29	—	18	7	11	18
23/25	—	58	68	53	28	—	19	1	15	7
25/27	—	21	21	32	19	—	45	1	41	20
27/29	—	18	17	11	17	—	58	5	43	25

As suspensões celulares de baço foram fraccionadas em gradientes descontínuos de albumina segundo o método de Dicke (6). A percentagem de células T foi determinada pelo método das rosetas espontâneas com glóbulos vermelhos de carneiro e o número de células B por imunofluorescência de membrana.

Quadro 3
 Resposta máxima à Fitohemaglutinina e Concanavalina A e Razão PHA/Con A de células de baço
 de doentes com Doença de Hodgkin

Fracção celular	Doente 1			Doente 2			Doente 3			Doente 4			Doente 5			Testemu- nho a)
	PHA	Con A	a)	PHA	Con A	a)	PHA	Con A	a)	PHA	Con A	a)	PHA	Con A	a)	
Não frac- cionadas	15	10	1.5	21	11	1.8	17	8	2.2	13	11	1.2	12	5	2.2	0.92
17/19	3	2	1.7	2	1	2	5	3	2.1	14	10	1.6	7	6	1.2	
19/21	5	3	1.7	12	7	1.6	12	7	1.6	15	12	1.3	8	5	1.7	
21/23	16	18	0.86	17	7	2.2	17	12	1.4	19	14	1.4	14	9	1.6	
23/25	22	12	1.9	18	2	<u>11</u>	20	5	3.9	16	11	1.5	17	5	3.4	
25/27	15	9	1.6	—	—		10	0.2	<u>34.6</u>	11	0.8	<u>13.2</u>	12	1	11.1	
27/29	15	8	1.8	7	0.5	<u>14</u>	3	0.2	<u>16.2</u>	9	0.5	<u>16</u>	10	0.3	25.5	

As células de baço foram separadas em gradientes de densidade e as diferentes fracções cultivadas com várias doses de PHA e Con A (Ver Materiais e Métodos). A resposta aos mitogénios está exprimida em $CPM \times 10^{-3}$. a) Razão entre a resposta máxima à PHA e a resposta máxima à Con A.

Resposta a mitogénios

As células de baço de doentes com Doença de Hodgkin respondem mais intensamente à PHA do que à Con A (Quadro 3)

Isto é o oposto do observado no baço humano normal (Quadro 3) que respondem mais intensamente a Con A. O aumento da razão PHA/CONA faz-se principalmente à custa duma diminuição acentuada da resposta à Concanavalina A.

A resposta máxima à PHA e Con A encontra-se geralmente nas fracções 21/23 e 23/25 (Fig. 1, Fig. 2) nas quais existem maiores números de células T (Quadro 2). No entanto queremos sublinhar não há correlação directa entre a percentagem de células T e a intensidade da resposta a estes 2 mitogénios (Quadro 3). Por outro lado, as células de diferentes densidades diferem também na resposta relativa à Con A e à PHA, exprimida pela razão PHA/Con A.

Podem assim considerar-se duas populações celulares distintas. As células que sedimentam nas fracções mais leves do que 25 % BSA, respondem de um modo semelhante a PHA e a Con A e apresentam índices PHA/Con A geralmente inferiores aos das células não fraccionadas. As células com densidade superior a 25 % BSA, respondem bem à PHA e mal à Con A, apresentando índices PHA/Con A muito elevados (Quadro 3).

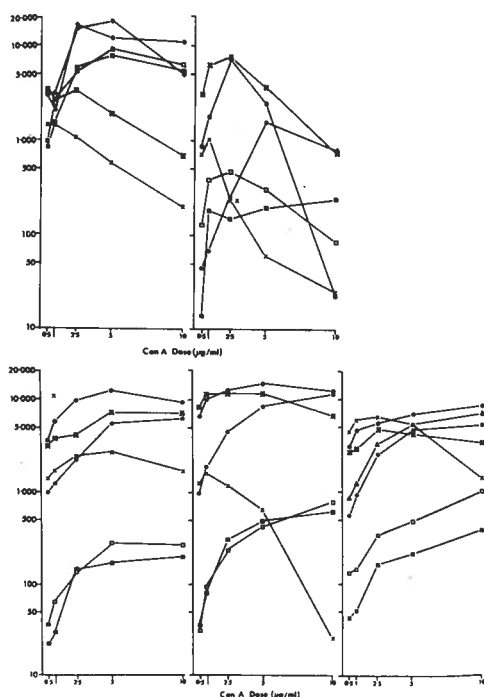


Fig. 1 — Resposta a PHA das fracções celulares com diferentes densidades de baço de doentes com doença de Hodgkin. Nas ordenadas estão representadas diferentes doses de fitohemaglutinina, e nas abcissas a incorporação de ^{14}C timidina exprimida em CPM/cultura

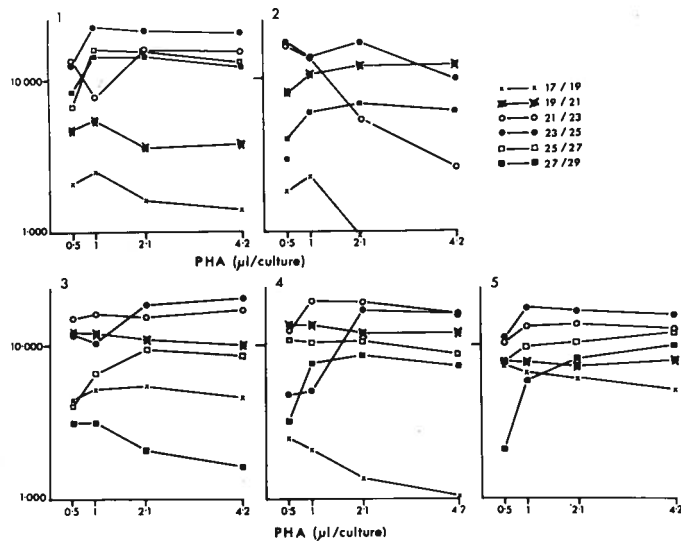


Fig. 2 — Resposta à Con A das frações celulares com diferentes densidades de baço de doentes com doença de Hodgkin. Nas ordenadas estão representadas diferentes doses de Concanavalina A; nas abcissas a microporção de ^{14}C timidina exprimida em CPM/cultura

DISCUSSÃO

O aumento do número de células sem marcadores de superfície (células *null*) nos baços de doentes com Doença de Hodgkin (Quadro 1) sugere que as alterações imunológicas observadas possam em parte ser atribuídas a um défice funcional do linfócito. Com efeito foram também descritas no sangue periférico destes doentes alterações da membrana linfocitária que podiam ser revertidas após tratamento com neuraminidase (Moroz et al 1977) ou incubação com FCS (Fuks et al 1976) e que podem ser devidas a factores bloqueantes do soro destes doentes.

Vários autores referem no entanto um aumento do número de linfócitos T no baço e gânglios linfáticos de doentes com Doença de Hodgkin principalmente quando envolvidos pelo processo tumoral (Aisenberg e Long 1975, Grifoni et al 1975, Hunter et al 1977, Joseph e Belpomme 1975) o que também observamos. Estes resultados sugerem a possibilidade que haja alterações da recirculação linfocitária com sequestro de linfócitos imunocompetentes em zonas envolvidas pelo tumor. Como está demonstrado que modificações na membrana do linfócito ocasionam alterações da recirculação linfocitária (Freitas e De Sousa 1975, Freitas e De Sousa 1976, Freitas et al 1978) é natural que os dois processos coexistam nesta doença.

As alterações das percentagens de linfócitos com o fenotipo T_{μ} e T_{γ} no sangue periférico e baço de doentes com doença de Hodgkin, e a normalização do quadro sanguíneo após esplenectomia (Gupta e Tan, in press), são também sugestivas de má distribuição linfocitária. Assim os linfócitos T_{γ} que respondem exclusivamente à Con A (Moretta et al 1976) e exercem funções supressoras (Moretta et al 1977) estão dimi-

nuidos no baço e aumentados no sangue periférico destes doentes (Gupta e Tan *in press*). Neste trabalho observamos um déficit selectivo da resposta à Con A nos baços destes doentes (Quadro 3) o que pode indicar uma ausência ou déficit funcional de uma população de células capazes de responder exclusivamente a este mitogénio. Tal população linfocitária foi também descrita no ratinho e caracterizada sob o ponto de vista funcional como uma população de células sesseis, sensíveis ao efeito da timentomia no adulto, resistentes aos efeitos do ALS (Stobo e Paul 1973) responsáveis pela geração de células citotóxicas e pela supressão do G.V.H. (Hayry et al 1976) i.e. apresentando características semelhantes às populações com o fenotipo Ly 1⁺, 2⁺, 3⁺ e Ly 2⁺, 3⁺ (Cantor e Boyse 1976). A retenção de células T supressoras no sangue periférico estaria de acordo com o quadro de energia observado (Aisenberg 1962, Kelly et al 1960). É no entanto necessário realçar que os estudos da reactividade relativa à Con A e PHA das células T *helper* e supressoras têm tido por vezes resultados contraditórios (Revisão em 6). Por outro lado, estudos feitos com células neoplásicas isoladas a partir de tumores de Hodgkin indicam que estas células têm um aumento da aderência, com capacidade de formação de todos os tipos de rosetas (Long et al 1977). Os resultados obtidos com T_μ e T_γ têm portanto de ser encarados com reservas.

Quando as suspensões celulares do baço de doentes com Doença de Hodgkin são fraccionadas em gradientes de densidade isolam-se duas populações linfocitárias com reactividade distinta aos mitogénios (Quadro 3, Fig. 1, Fig. 2). As células leves respondem de um modo semelhante à PHA e à Con A, e as células densas respondem preferencialmente à PHA. Embora as razões PHA/Con A das diferentes fracções celulares sejam semelhantes às do baço do ratinho (Stobo e Paul 1973) neste animal a razão PHA/Con A das células densas é devida a uma resposta elevada à PHA enquanto que no humano é resultante de uma ausência de resposta à Con A. É portanto possível que estas diferentes populações tenham funções diferentes nestas duas espécies. Resultados preliminares indicam no entanto que as fracções densas têm funções supressoras (Rocha observações não publicadas) tal como as fracções densas do baço do rato (Rocha et al 1979) e ratinho (Whisler e Stobo 1976). O aparecimento na Doença de Hodgkin duma população linfocitária densa, com resposta exclusiva à PHA pode portanto estar relacionada com o processo patológico da doença levando ao sequestro selectivo no baço de células capazes de responder a PHA mas não a Con A. Por outro lado pode também resultar dum déficit funcional das células densas que as torne incapazes de responder a este mitogénio. Estas possibilidades estão presentemente a ser estudadas.

Agradecimentos

Agradecemos ao Dr. A. Araújo pela dádiva do baço de um individuo normal e à Dr.^a D. Filipa pela sua colaboração na determinação dos marcadores de superfície em alguns dos casos estudados. B. Rocha recebeu uma bolsa de estudo da Fundação Calouste Gulbenkian durante a sua estadia em Nova York, onde este trabalho foi subsidiado pelo Memorial Sloan Kettering Cancer Center Cardinal Fund.

SUMMARY

A STUDY ON SPLEEN LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH HODKIN'S DISEASE

In this study spleen lymphocyte subpopulations from five patients with Hodgkin's disease were investigated. When the spleen was not involved by the tumor, an increased number of null cells and a reduced number of B cells was observed. Patient number 3,

which spleen was involved had a high percentage of T lymphocytes. The mitogenic response to PHA was similar to that obtained from peripheral blood of normal donors, while the response to Con A was reduced. When lymphocytes were fractionated in density gradients, a population unable to respond to Con A was isolated in the denser fractions of the gradient. The implications of the present findings to the understanding of the physiopathological changes in Hodgkin's disease are discussed.

BIBLIOGRAFIA

- AISENBERG AC: Studies of delayed hypersensitivity in Hodgkin's disease. *J Clin Invest* 41: 1964, 1962.
- AISENBERG AC, LONG JC: Lymphocyte surface characteristics in malignant lymphoma. *Am J Med* 58: 300, 1975.
- CANTOR H, BOYSE EA: Regulation of cellular and humoral immune responses by T cell subclasses. Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology, Vol. XLI Cold Spring Harbour Laboratory eds. p. 23, 1976.
- DE SOUSA M, YANG M, LOPES-CORRALES E, TAN C, DUPONT B, GOOD RA: Ecotaxis. The principal and its application to the study of Hodgkin's disease. *Clin Exp Immunol* 27: 143, 1977.
- DICKE KA, TRIDENTE G, VAN BEKKUM DW: The selective elimination of immunologically competent cells from bone marrow and lymphocyte cell mixtures. III. *In vitro* test for detection of immunocompetent cells in fractionated mouse spleen cell suspensions and primate bone marrow suspensions. *Transplantation* 8: 422, 1969.
- DUTTON RW: Suppressor T cells. *Transplant. Rev* 26: 39, 1975.
- FREITAS AA, DE SOUSA M: Control mechanisms of lymphocyte traffic: Modification of the traffic of ⁵¹Cr labelled mouse lymph node cells by treatment with plant lectins. *Eur J Immunol* 5: 831, 1975.
- FREITAS AA, DE SOUSA M: Control mechanisms of lymphocyte traffic. Altered migration of ⁵¹Cr labelled mouse lymph node cells pretreated *in vitro* with phospholipases. *Eur J Immunol* 10: 703, 1976.
- FREITAS AA, ROCHA B, CHIAU JW, DE SOUSA M: Divergent actions of monomeric, dimeric and tetrameric Concanavalin A on lymphocyte traffic. *Cell Immunol* 35: 59, 1978.
- FUKS Z, STROBER S, KAPLAN HS: Interaction between serum factors and T lymphocytes in Hodgkin's disease. *New Engl J Med* 295: 501, 1976.
- GRIFONI V, DEL GIACCO GS, MANCONI PE, TOGNELLA S, MANTOVANI G: Lymphocytes in spleen in Hodgkin's disease. *Lancet* 1: 332, 1975.
- GUPTA S, TAN C: Subpopulations of human T lymphocytes. XIV Abnormality of T cell locomotion and of distribution of subpopulations of T and B lymphocytes in peripheral blood and spleen from children with untreated Hodgkin's disease. *J Clin Immunol Immunopathol. in press.*
- HAYRY P, ROBERTS PJ, RANKY A, WEBER T: Selective response of mouse T lymphocytes to different T mitogens and in mixed lymphocyte cultures induced cytotoxicity reaction. *Cell Immunol* 25: 121, 1976.
- HUNTER CP, PINKUS G, WOODWARD L, MOLONEY WC, CHURCHILL WH: Increased T lymphocytes and Ig MEA-receptor lymphocytes in Hodgkin's disease spleens. *Cell Immunol* 31: 193, 1977.
- JONDAL M, HOLM G, WIGZELL H: Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med* 136: 207, 1972.
- JOSEPH RR, BELPOMME D: T and B lymphocytes in spleen in Hodgkin's disease. *Lancet* 1: 747, 1975.
- KELLY WD, LANE DL, VARCO RL, GOOD RA: Investigation of Hodgkin's disease with respect to problems of homotransplantation. *N Y Acad Sci* 87: 187, 1960.
- LEVY R, KAPLAN HS: Impaired lymphocyte function in untreated Hodgkin's disease. *N Engl J Med* 290: 181, 1974.
- LONG JC, ZAMECNIK PC, AISENBERG AC, ATKINS L: Tissue culture studies in Hodgkin's disease. Morphologic, cytogenetic, cell surface and enzymatic properties of cultures derived from splenic tumors. *J Exp Med* 145: 1484, 1977.

- LUKES RJ, CRAVER LF, HALL TC, RAPPAPORT H, REUBEN P: Report of the Nomenclatures Committee of the American Association for Cancer Research—Histological Classification of Hodgkin's disease. *Cancer Res* 26: 1311, 1966.
- MATCHETT K, HUANG AT, KREMER WB: Impaired lymphocyte transformation in Hodgkin's disease: Evidence for depletion of circulating T lymphocytes. *J Clin Invest* 52, 1908, 1973.
- MORETTA L, FERRARINI M, MINGARI M, MORETTA A, WEBB S: Subpopulations of human T cells identified by receptors for immunoglobulins and mitogen responsiveness. *J Immunol* 117: 2171, 1976.
- MORETTA L, WEBB S, GROSSI CE, LYDYARD PM, COOPER MD: Functional analysis of two human T cell subpopulations: Help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. *J Exp Med* 146, 184, 1977.
- MOROZ C, GILER S, KUPFER B, URCA I: Lymphocytes bearing surface ferritin in patients with Hodgkin's disease and breast cancer. *N Engl J Med* 296: 1172, 1977.
- ROCHA B, FREITAS AA, DE SOUSA M: Characterization of rat spleen T cell populations. Interactions in regulation of *in vitro* response to Concanavalin A. *Immunol* 36: 619, 1979.
- STOBO JD, PAUL WE: Functional heterogeneity of murine lymphoid cells III. Differential responsiveness of T cells to phytohemagglutinin and Concanavalin A as a probe for T cell subsets. *J Immunol* 110: 362, 1973.
- WHISLER RL, STOBO JD: Heterogeneity of murine regulatory T cells. I. Subpopulations of amplifier and suppressor T cells. *J Exp Med* 144: 398, 1976.

Pedido de separatas: *Benedita Rocha*

Departamento de Imunologia
Faculdade de Ciências Médicas de Lisboa
Campo Santana, 130
Lisboa - Portugal