

## ESTUDO DOS LINFÓCITOS CIRCULANTES POR ANTICORPOS MONOCLONAIS NA MIASTENIA GRAVE

PAULO E. MARCHIORI \* — ALBERTO J. DUARTE \*\* — M. IZABEL A. M. BIROLI \*\*\*  
CRISTINA A. FIGUEIREDO \*\*\* — MILBERTO SCAFF \*\*\*\*  
J. LAMARTINE DE ASSIS \*\*\*\*

---

**RESUMO** — Os autores avaliam os linfócitos T (CD3, CD4, CD8, CD4/8) por anticorpos monoclonais e rosácea em 20 pacientes e linfócitos B por Fab' por imunofluorescência em 9 pacientes com miastenia grave. Observam elevação significante na população de linfócito B e redução nos linfócitos T totais CD3+ por rosáceas. Não foram observadas modificações nas subpopulações celulares com timentomia e corticosteróides.

**Evaluation of circulant lymphocytes in myasthenia gravis by monoclonal antibodies.**

**SUMMARY** — A significant decline of CD3 cell detected by rosettes and a significant increased of B cell populations were observed. The total CD3+, helper CD4+ and suppressor CD8+ T-cell subsets showed no significant variation em relation to sex, age thymectomy and corticotherapy by monoclonal antibodies.

---

Evidências imunológicas na miastenia grave (MG) se expressam pela presença de auto-anticorpos<sup>4,15</sup>. Ocorrem produção de anticorpo contra o receptor de acetilcolina (AChR) e dificuldades na transmissão nervosa na junção neuromuscular (JNM)<sup>2,6</sup>. Esse processo é o resultado final da estimulação policlonal dos linfócitos B? A interação de inúmeros fatores — genético, hormonal, ambiental e estímulo antigênico — propicia modificações no microambiente do timo, com alterações da barreira hemotímica. As relações timo-MG são amplas no aspecto histopatológico, imunológico e terapêutico<sup>1,18</sup>. Ocorre maturação progressiva dos linfócitos T até segregação de fenótipos de células auxiliaadoras (CD4+), supressoras (CD8+) e totais (CD3+), funcionalmente maduras<sup>11</sup>. Há aumento das células B e Tg e redução das células T<sup>2,11,14,19</sup>. Possivelmente ocorra modificação inicial na célula T-H (auxiliadora). A intensidade e duração de reação imune no circuito são determinadas por mensagens (interleucinas) entre os diferentes tipos celulares<sup>6,10,16</sup>. Desequilíbrios no sistema podem concorrer para o estado de doença<sup>9-12,15,16</sup>.

Contrastando com a imunidade humoral, os resultados das pesquisas na imunidade celular na MG têm sido pobres até o momento. O emprego dos anticorpos monoclonais, recentemente, abriu novas perspectivas neste campo, motivo pelo qual, utilizamos este método na avaliação das subpopulações de linfócitos T, em 20 pacientes com MG.

---

Disciplina de Neurologia Clínica (DNC) do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) e Laboratório de Imunogenética e Transplante Experimental (LIM 73) do Instituto dos Laboratórios de Investigação Médica (LIM) do Hospital das Clínicas (HC) da FMUSP: \* Médico Assistente da DNC; \*\* Professor Livre Docente da Disciplina de Alergia e Imunologia da FMUSP; \*\*\* Biologista do LIM 73; \*\*\*\* Professor Adjunto da DNC. Trabalho financiado pelo LIM, HC, FMUSP.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Vinte pacientes com MG com média de idade de  $28,85 \pm 9,97$  anos (a) diagnosticados por história clínica, eletromiografia e testes imunológicos foram submetidos a determinação de subpopulações linfocitárias; duração média de doença de  $6,22 \pm 5,74$  a; 10 eram do sexo feminino e 10 do masculino. Quinze foram submetidos a timentomia e 5 não foram timentomizados. Quatro usaram corticosteróides. Os valores de referência foram extraídos de uma amostra de 17 doadores de sangue e cada paciente foi analisado em paralelo com indivíduo controle. Todos foram analisados para subpopulações de linfócitos (CD3, CD4 CD8) por anticorpo monoclonal; linfócitos totais por rosácea E foram analisados em 9; linfócitos B por (Fab)<sub>2</sub>, em 9 pacientes.

Quantificação de linfócitos T e B — Células mononucleares foram obtidas através de gradiente de Ficoll-Hypaque. A quantificação de linfócitos T, B e subpopulações foram analisadas através de técnicas anteriormente descritas (8). Linfócito B — Células mononucleares foram tratadas com fragmento (Fab)<sub>2</sub> de anticorpo de coelho anti-imunoglobulina humana (Cappell Laboratories, Cochranville, PA, USA) durante 60 minutos a 4°C. Posteriormente, as células foram lavadas com solução de Hanks azida a 0,1% e enumeradas em microscópio munido com luz ultravioleta. Linfócito T — Células mononucleares foram tratadas com anticorpo monoclonal (CD3, CD4, CD8 — Ortho Diagnostic Systems Inc, Raritan, New Jersey, USA) durante 60 minutos a 4°C. Posteriormente, estas células foram lavadas e anticorpo de coelho anti-IgG de camundongo (Cappell Laboratories, Cochranville, PA, USA) foi adicionado seguindo-se nova incubação por 60 minutos. A seguir estas células foram lavadas em Hanks azida a 0,1% e enumeradas em microscópio munido de luz ultravioleta. A presença simultânea de anticorpos CD4 e CD3 na superfície celular foi realizada por comparação do número de células fluorescentes após a incubação individual de CD4 e CD8 e com ambos os anticorpos. Os resultados foram expressos em % de células positivas ou em números absolutos; células T foram avaliadas também pela rosácea E de carneiro.

RESULTADOS

Os níveis médios de subpopulações de linfócitos são observados na tabela 1 e na figura 1. Os pacientes miastênicos e os controles diferem quanto a (Fab)<sub>2</sub> ( $z=2,46$ ;  $\alpha=0,05$ ) e rosáceas ( $z=1,66$ ). As flutuações, relacionadas ao grupo controle, mostram mínimas modificações e declínio de 4,70% nos linfócitos totais (células CD3+), 4,32% nas células supressoras/indutoras (CD8+) e discreta elevação (6,40%) em células auxiliares (CD4+). Linfócitos B, por (Fab)<sub>2</sub>,

Subpopulação	Nº de pacientes	Média	Desvio padrão	Significância (a)	Mínima	Máxima
* CD3+	20	55,18	18,70	NS	36	82
Controle		57,50	1,76			
* CD4+	20	41,15	14,38	NS	27	64
Controle		40,00	5,09			
Rosácea	9	55,80	20,86	S	43,5	75
Controle		69,00	6,51			
Fab' <sub>2</sub>	9	17,40	7,17	S	10,0	29,0
Controle		12,10	2,65			

Tabela 1 — Avaliação de linfócitos no sangue de pacientes com miastenia grave. CD3+, células totais; CD4+, células auxiliares; CD8+, células supressoras e indutoras; \*, anticorpos monoclonais; (a), teste U, Mann-Whitney ( $\alpha = 0,05$ ); NS, não significante; S, significante.

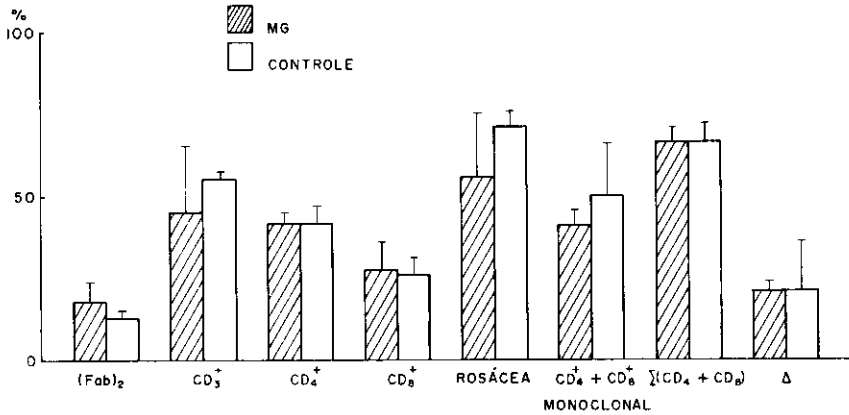


Fig. 1 — Concentrações de subpopulações de linfócitos na miastenia grave.

revelam aumento de 55%; linfócitos totais por rosácea E diminuem de 11%. A concentração de células CD4+ e CD8+, determinada por adição dos anticorpos em conjunto é 45,94±4,20 (49,1±15,20), enquanto a somatória das subpopulações individualizadas é 66,77±4,16 (67,25±5,73) (Tabela 2; Fig. 2). A influência da timectomia nas subpopulações linfocitárias é vista na tabela 3 e na figura 3. Não houve modificações quanto a idade, sexo, duração da doença e o emprego de corticosteróides.

COMENTÁRIOS

Células CD3+ (linfócitos T totais), avaliadas por anticorpos monoclonais, não mostraram diferenças significantes em relação ao grupo controle, contrastando com Christadoss<sup>5</sup>, que mostrou número e função diminuídos, e Skolnik<sup>20</sup>, que revelou CD3 diminuídos em miastênicos com idade superior a 35 anos; CD3+ determinadas por rosácea estão significativamente reduzidas na MG. Dessa forma acreditamos que

Subpopulação	Nº de pacientes	Frequência de subpopulações de linfócitos				Signifi- cância**	Anticorpo monoclonal
		Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima		
OKT4+ - OKT8+	9	45,94	4,20	40	55	NS	associado
Controle		49,10	15,20	22,5	60		
(OKT4+ + OKT8+)	9	66,77	4,16	60	70,5	NS	isolado
Controle		67,25	5,73	60	74		
Variação celular	9	20,83	3,94	15,5	25,5	NS	
Controle		20,87	21,24	2,5	51,5		

Tabela 2 — Linfócitos com dupla marcação em miastenia grave: OKT4+ - OKT8+ = células determinadas pela utilização de OKT4 e OKT8 associadamente; (OKT4+ + OKT8+) = somatória de células determinadas pelo anticorpo isoladamente; variação células (delta), avaliação na forma apresentada; \*\*, teste de Mann-Whitney (alfa = 0,05); NS, não significante.

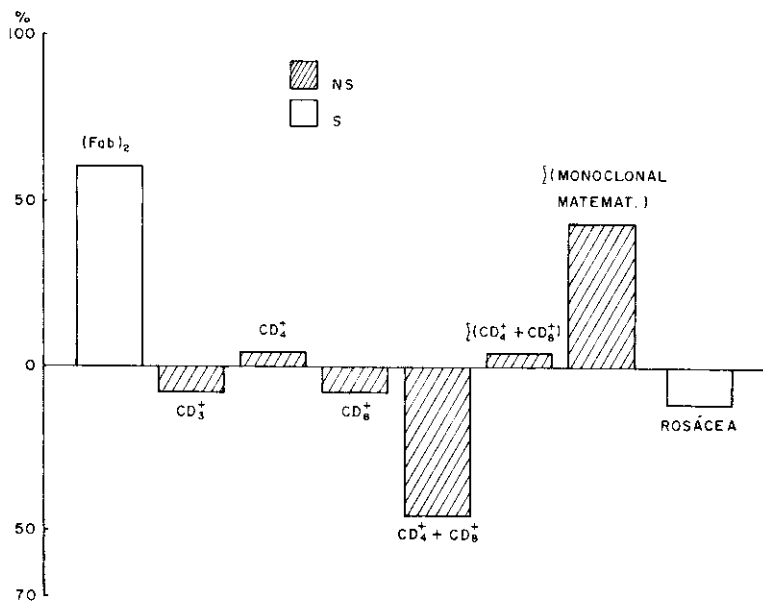


Fig. 2 — Subpopulações de linfócitos na miastenia grave.

Terapêutica/Subpopulação	Frequência de subpopulações de linfócitos				Significância**
	Média	Desvio padrão	Mínima	Máxima	
Timectomizado/OKT3+	58,03	12,53	29	82	NS
Controle	58,8	16,10	36	81,5	
Timectomizado/OKT4+	44,76	9,84	27	64	NS
Controle	41,3	11,80	22,5	54	
Timectomizado/OKT8+	28,62	14,05	16	76	NS
Controle	25,1	10,66	12,5	41	
Timectomizado/OKT4/8	1,87	0,66	1,3	4,0	NS
Controle	1,83	0,93	1,1	3,4	

Tabela 3 — Influência da timectomia nas subpopulações linfocitárias na miastenia grave. OKT3, células totais; OKT4+, células auxiliaadoras; OKT8+, células supressoras e indutoras; \*\*, teste U, Mann-Whitney (alfa = 0,05); NS, não significante.

a ambiguidade de comportamento da população dos linfócitos totais por técnicas metodológicas diferentes pode sugerir que os linfócitos determinados por rosácea estejam comprometidos na MG.

As células auxiliaadoras (CD4+) e supressoras (CD8+) não se comportaram de forma diferente ao grupo controle, embora Haynes<sup>9</sup> e Skolnik<sup>20</sup> mostrassem subpopulação CD4+ reduzida, que se normalizou após a timectomia em miastênicos com

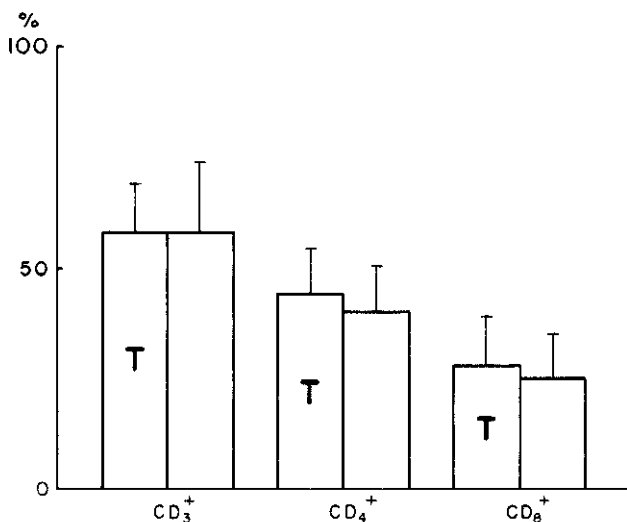


Fig. 3 — Influência da timectomia nas subpopulações de linfócitos na miastenia grave.

timo atrófico, e Miller<sup>16</sup> verificasse elevação dos níveis das células CD4+. As células indiferenciadas não mostraram diferenças estatisticamente significantes em relação aos controles, segundo a técnica e os achados de Berrih<sup>3</sup> que encontrou CD4+ e CD8+ elevados, que se reduziram após a timectomia, embora supomos que a técnica utilizada expresse células inespecíficas e a ausência de controles adequados comprometam os resultados.

Não encontramos flutuações estatisticamente significantes nos subgrupos de linfócitos T nos grupos timectomizados submetidos a corticoterapia e nem em relação a sexo e idade. Verificamos, como Christadoss<sup>5</sup>, elevações significativas nos linfócitos B que podem expressar ativação policlonal de células B na geração de auto-anticorpos.

Os achados discordantes e até mesmo conflitantes da imunidade celular na MG podem expressar heterogeneidade e polimorfismo da doença, além da variabilidade entre os grupos considerados nos diferentes estudos<sup>19</sup>. Dessa forma, parecem ocorrer de forma unânime modestos desequilíbrios das células imunorregulatórias circulantes na MG. Acreditamos que essas variações podem ser epifenômeno ou representar perda seletiva de células imunorregulatórias com repercussão na patogênese da MG. O mecanismo intrínseco da disfunção primária que permite a produção de anticorpos contra antígeno ainda não está elucidado. Destarte, queremos crer que mínimas alterações no sistema imunológico, interagindo a fatores humorais podem ser responsáveis pelo desequilíbrio na homeostase do indivíduo geneticamente determinado, contribuindo para a gênese da doença.

#### REFERÊNCIAS

1. Abdou NI, Lisak RP, Zweiman B, Abrahamsohn I, Penn A — The thymus in myasthenia gravis: evidence for altered cell populations. *N Engl J Med* 291:1271, 1974.
2. Adner MM, Sherman JD, Isé C, Schwab RS, Dameshek W — An immunologic survey of forty-eight patients with myasthenia gravis. *N Engl J Med* 271:1327, 1964.
3. Berrih S, Gaud G, Bach MA, Le Brigand H, Binet JP, Bach JF — Evaluation of T cell subsets in myasthenia gravis using anti-T cell monoclonal antibodies. *Clin Exper Immunol* 45:1, 1981.
4. Biesecker G, Koffler D — Immunology of myasthenia gravis. *Hum Path* 14:419, 1983.

5. Christadoss P, Dauphine N, Lindstrom J, Dang H, Fernandes G, Talal N — Deficient T cell mitogen response in murine experimental auto immune myasthenia gravis: a defect in the adherent cell population. *Cell Immunol* 79:358, 1983.
6. Dosch HM, Shore A — Hypothesis: the role of interleukins in lymphopoiesis are important in autoimmune diseases? *J Rheumatol* 9:353, 1982.
7. Dropcho EJ, Richman DP, Antel JP, Arnason BGW — Defective mitogenic response in myasthenia gravis and multiple sclerosis. *Ann Neurol* 11:456, 1982.
8. Duarte AJS, Carpenter CB, Strom TB — Expression of T cell differentiation antigens and Ia on rat cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 128:580, 1982.
9. Haynes BF, Harden EA, Orlanow CW, Eisenbarth GS, Wechsler AS, Hensley LL, Roses AD — Effect of thymectomy on peripheral lymphocyte subsets in myasthenia gravis: selective effect on T-cell in patients with thymic atrophy. *J Immunol* 131:773, 1983.
10. Jerne JK — Towards a network theory of the immune system. *Ann Immunol* 125:373, 1974.
11. Kamo IL, Furukawa S, Tada A, Mano Y, Iwasaki Y, Furuse T — Monoclonal antibody to acetylcholine receptor: cell line established from thymus of patients with myasthenia gravis. *Science* 215:995, 1982.
12. Kuroda Y, Oda K, Neshige R, Shibasaki H — Exacerbation of myasthenia gravis after removal of a thymoma having a membrane phenotype of suppressor T cells. *Ann Neurol* 15:400, 1984.
13. Landi G, Galli M, Ciboddo G, Colombo R, Scarlato G — Lymphocyte subpopulations and surface membrane immunoglobulins in myasthenia gravis. *J Neurol Neurosurg Psychiat* 45:158, 1982.
14. Lisak RP, Zweiman B, Skolnik P, Levinson A, Moskovitz AR, Guerrero F — Thymic lymphocyte subpopulations in myasthenia gravis. *Neurology* 33:868, 1983.
15. Mendes N, Kopersztych S, Saraiva S, Assis JL — Imunidade celular na miastenia grave. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo* 33:272, 1978.
16. Miller AE, Hudson J, Tindall RSA — Immune regulation in myasthenia gravis: evidence for an increased suppressor T-cell population. *Ann Neurol* 12:348, 1982.
17. Newsom-Davis J, Willcox N, Scadding G, Calder L, Vicent A — Anti-acetylcholine receptors antibody synthesis by cultured lymphocytes in myasthenia gravis: thymic and peripheral blood cell interactions. *Ann NY Acad Sci* 377:393, 1981.
18. Scadding GK — The role of the thymus in myasthenia gravis. In Rose FC (ed): *Clinical Neuroimmunology*, Blackwell, Oxford, 1979, pg 128.
19. Shore A, Limatibul S, Dosch HM, Celfand WW — Identification of two serum components regulating the expression of T-lymphocytes function in childhood myasthenia gravis. *N Engl J Med* 201:625, 1979.
20. Skolnik PR, Lisak RP, Zweiman B — Monoclonal antibody analysis of blood T-cell subsets in myasthenia gravis. *Ann Neurol* 11:170, 1982.