

AVALIAÇÃO DA SÍNTESE INTRATECAL DE IMUNOGLOBULINAS NO TRANSPLANTE DE MEDULA ÓSSEA

SÉRGIO MONTEIRO DE ALMEIDA*, JOSÉ ANTONIO LIVRAMENTO*,
RICARDO PASQUINI**, VIVIANA BOCCARDI PALOU***,
APARECIDO MENDES DE OLIVEIRA****, ELVIRA MISSAKO DOI*****,
MARGARET ONO*****, MIRNA CIGEMI ASO*****, EURÍPIDES FERREIRA*****

RESUMO - O envolvimento da doença do enxerto contra o hospedeiro crônica (DECH-C) no sistema nervoso central tem sido especulado. Há uma série de semelhanças clínicas e fisiopatológicas entre DECH-C e doenças auto-imunes, o que leva a questionar sobre a síntese intratecal de imunoglobulinas. Este estudo avalia esta síntese, em particular durante a DECH-C, de forma quantitativa e qualitativa, a fim de observar sua incidência e possível fisiopatologia. Foram estudadas amostras pareadas de LCR e soro de 33 pacientes com leucemia mielóide crônica submetidos a transplante de medula óssea (TMO) alogênico, com doador aparentado, HLA idêntico. As amostras foram coletadas nos períodos pré TMO, pós TMO e concomitante à DECH-C. Não foi evidenciada produção intratecal de IgG ou IgA nas várias fases do TMO. Apenas casos isolados evidenciaram síntese, inclusive de IgM, durante a DECH-C.

PALAVRAS-CHAVE: doença do enxerto contra o hospedeiro, barreira hemato-encefálica, auto-imunidade, imunoglobulinas, líquido cefalorraquidiano, transplante de medula óssea.

Immunoglobulins intrathecal synthesis evaluation in bone marrow transplantation

ABSTRACT - The central nervous system involvement in chronic graft versus host disease (GVHD) has been suggested. Chronic GVHD resembles auto immune connective tissue disorders. In order to investigate the immunoglobulin intra blood brain barrier (BBB) synthesis during chronic GVHD, and contribute to understanding the pathophysiology of the disease, we studied 33 patients who underwent allogeneic bone marrow transplants (BMT) from HLA identical related donors. Immunoglobulin intra BBB synthesis was investigated quantitative and qualitatively. The samples were collected pre BMT, pos BMT and during chronic GVHD. There were no evidence of immunoglobulin intra BBB synthesis, and no oligoclonal bands were found. Only isolated cases suggested IgG and IgA intra BBB synthesis, and in one case IgM during GVHD.

KEY WORDS: graft-versus-host disease, blood-brain barrier, auto immunity, immunoglobulins, cerebrospinal fluid, bone marrow transplantation.

A doença do enxerto contra o hospedeiro (DECH) ocorre em 30 a 60% dos pacientes que se submetem ao transplante de medula óssea (TMO), é a sua principal complicação e responsável por

Estudo realizado na disciplina de Neurologia e Serviço de TMO do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), Disciplina de Imunologia da Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo (EPM-UNIFESP) e Centro de Investigações em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP): *Neurologista; **Professor Titular, Disciplina de Hematologia; ***Bióloga; ****Biomédico; *****Bióquímica; *****Professor Adjunto, Disciplina de Imunologia. Projeto realizado com apoio da FAPESP (932705-6) e CAPES. Aceite: 20-agosto-1997.

Dr. Sérgio Monteiro de Almeida - Especialidade de Neurologia, Hospital de Clínicas UFPR- Rua General Carneiro 181, sala 1238 - 80060-900 Curitiba PR - Brasil.

25% da mortalidade^{3,35}. Foi descrita inicialmente em cobaias na década de 50³⁰. A primeira descrição de DECH, em humanos, foi feita por Mathé et al.(1963)²², em um paciente com leucemia aguda linfoblástica, que após receber medula óssea alógena de seis doadores, desenvolveu dermatite descamativa, diarreia e perda de peso. Para o desenvolvimento da DECH, são necessários três critérios básicos⁵: 1. o enxerto deve conter linfócitos T imunologicamente competentes; 2. deve haver histoincompatibilidade entre doador e hospedeiro; 3. o receptor deve ser incapaz de montar uma resposta imune eficiente para destruir as células transplantadas. Posteriormente, observou-se uma reação inapropriada contra auto-antígenos, que ocorre tanto na DECH crônica como na DECH dos transplantes singênicos ou autólogos³⁵.

O TMO preenche todos esses critérios: a medula óssea é um órgão com grande concentração de linfócitos T; os pacientes recebem doses imunossupressivas de quimioterapia e/ou radiação antes da infusão da medula óssea, o que os torna incapazes de montar uma resposta imune adequada⁴.

A DECH pode ser classificada em aguda (DECH-A) e crônica (DECH-C). São duas doenças distintas e independentes. Fisiopatologicamente a DECH-A representa uma reação alógena dos linfócitos T contra os antígenos de histocompatibilidade do receptor, mais especificamente antígenos menores de histocompatibilidade. Portanto, trata-se de uma doença alo-reativa^{8,39}. A DECH-C, por outro lado, representa uma reação auto-imune, devida a linfócitos T auto-reativos, que não foram adequadamente destruídos no timo³⁹. Estudos experimentais sugerem, fortemente, uma patofisiologia de origem auto-imune na DECH-C²⁶. A analogia entre DECH-C e doenças auto-imunes é sustentada pela existência de auto-anticorpos circulantes, anticorpos antinucleares e depósitos de imunoglobulinas e complemento na junção dermo-epidérmica^{12,18,33,35}. Estudos sobre a patogênese da DECH-C sugerem uma imunopatogênese complexa envolvendo tanto imunidade celular como humoral³³. A presença de auto-anticorpos, níveis elevados de IgG sérica e complexos imunes de IgG fala a favor de hiperatividade de células B¹⁰. Na maioria das colagenoses encontramos alteração de barreira hemato-encefálica (BHE) ou alteração de integridade ou síntese intratecal de imunoglobulinas, principalmente no lúpus eritematoso sistêmico^{6,9}.

O envolvimento do sistema nervoso central (SNC), diretamente pela DECH é assunto ainda controverso e vários autores sugerem que este seja poupado. Esta hipótese é sustentada por séries publicadas, nas quais não foi encontrado envolvimento direto do SNC, e decorreria do fato do SNC ser um sítio imunológico privilegiado^{25,27}. Porém, mais recentemente, alguns autores chamam a atenção para a possibilidade de ocorrer DECH no SNC⁴⁰ e alguns casos relatados procuram relacionar alterações clínicas e neuropatológicas com a DECH, em especial na forma crônica. Esta hipótese encontra apoio em estudos experimentais^{14,16}, e pela semelhança clínica e principalmente fisiopatológica entre a DECH-C e colagenoses^{10,18,33}.

Frente a esta similaridade, este estudo tem por objetivo avaliar a produção intratecal de imunoglobulinas durante a DECH-C, uma vez que em algumas colagenoses esta pode ser encontrada. Este aspecto da DECH-C não foi ainda avaliado.

CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram analisadas amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) e soro de pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC) submetidos a TMO alógeno, com doador aparentado HLA idêntico e realizados no Serviço de TMO do HC-UFPR, no período de 24-junho-93 a 10-março-95. As amostras foram coletadas de forma seqüencial e com aquiescência do paciente.

As amostras de LCR foram coletadas através de punção lombar, no período pré TMO, aproximadamente aos 100 dias pós TMO e, no seguimento ambulatorial, quando houve desenvolvimento de DECH-C. As amostras que constituem o grupo pós TMO foram coletadas em média no dia +102 (DP 10,07), variando do dia +86 ao dia +132, com mediana de 99 e moda de 98. As amostras do grupo com DECH-C foram coletadas em média no dia +191 (DP 86,15), variando do dia +95 ao dia +424, com mediana de 178 e moda de 155. Foram excluídas as amostras de LCR com acidente de punção com mais de 2.500 hemácias/mm³, para evitar erro nos cálculos de imunoprodução intratecal⁹. Concomitantemente foram coletadas amostras de soro.

O diagnóstico de DECH-C foi estabelecido por critérios clínicos e confirmado por pelo menos um dos métodos: teste de Schirmer e/ou biópsia de pele, fígado, mucosa labial ou retal. A classificação da extensão da DECH-C, seguiu os critérios de Shulman et al. (1980)³³.

Grupo de estudo - Formado por 33 pacientes, com um total de 77 amostras de LCR pareadas com amostras de soro, sendo 33 amostras no grupo pré TMO, 27 no pós TMO e 17 no grupo com DECH-C.

A média das idades foi 30 anos (DP de 10 anos), variando de 13 a 47 anos, com mediana de 30 e moda 29 anos. Vinte e cinco pacientes eram do sexo masculino e 8 do sexo feminino. Vinte e quatro pacientes eram da raça caucasiana, 9 da raça negra.

O índice de Karnofsky em 28 pacientes foi de 100%, em 3 de 90% e em dois de 70%. A média do início da LMC foi de 24,85 meses (DP 15,96), variando de 3 a 72 meses, com mediana de 20 e moda de 36 meses. Todos os pacientes apresentavam doença restrita à medula óssea. Antes do condicionamento para o TMO, 27 pacientes encontravam-se na primeira fase crônica, 4 na primeira fase acelerada, um em crise blástica, e um na primeira recidiva pós TMO.

Todos os pacientes receberam quimioterapia antes do condicionamento do TMO, com hidroxiuréia e/ou bussulfan, em 4 pacientes houve associação com citarabine, interferon ou tioguanina. Todos os pacientes foram submetidos ao mesmo esquema de condicionamento, constituído por bussulfan e ciclofosfamida. A profilaxia da DECH na forma aguda, consistiu de metotrexato, ciclosporina e corticóide sistêmico. Nenhum paciente foi submetido à quimioterapia intratecal ou radioterapia.

Dos 33 pacientes estudados, 5 desenvolveram DECH-A (15,15%) e 17 DECH-C (51,51%). Em 13 casos a DECH-C foi classificada como de novo, em 3 quiescente, e em um progressivo. Concernente à extensão da DECH-C no dia da coleta de LCR, 15 foram classificados como extensos, e 2 como limitados. Conforme a gravidade 8 eram leves, 8 moderados, e um severo. A média do início da DECH-C se deu no dia +168 pós TMO (DP 70,62), variando do dia +86 ao dia +300, com mediana de 150. O diagnóstico de DECH-C foi apenas clínico em 7 pacientes, e clínico e histológico em 10 pacientes.

Grupo controle - Constituído de 30 pacientes com exame neurológico normal, encaminhados ao ambulatório de punção líquórica e com indicação não sugestiva de síntese intratecal de imunoglobulinas. Além disso apresentavam no LCR: citologia, glicose, proteína total e eletroforese de proteínas, em acetato de celulose, normais e reações imunológicas para cisticercose (ELISA e IFI), toxoplasmose (ELISA e IFI) e VDRL negativos. O LCR foi coletado por punção lombar e simultaneamente foram coletadas amostras de soro.

No Grupo Controle a média das idades foi 30,7 anos (DP de 6,81), variando de 18 a 51 anos, mediana de 30 anos, moda de 34 anos. Dezesete pacientes eram do sexo masculino e 13 do sexo feminino. O índice de Karnofsky foi de 100% em todos os pacientes.

Métodos

No LCR, a proteína total foi dosada (mg/dl) pelo método turbidimétrico com ácido sulfossalicílico 3% e foi realizada eletroforese de proteínas em acetato de celulose, após concentração⁹. No plasma a proteína total foi determinada pelo método colorimétrico do biureto (Merck®) e, também, realizada eletroforese em acetato de celulose.

O estado imunológico basal do LCR foi estabelecido pela pesquisa de anticorpos anti *Cysticercus cellulosae* (IFI e ELISA indireto), anti *Toxoplasma gondii* (IgG-IFI e ELISA indireto; IgM ELISA captura) e VDRL.

O restante das amostras de LCR e soro foi aliquoteado em frascos de 2ml e mantido a -80°C, para posterior avaliação quantitativa e qualitativa da síntese intratecal de imunoglobulinas. As quantificações de albumina, IgG, IgA, IgM no LCR e soro, foram realizadas por imunodifusão radial simples (IDR) (LC-Partigen® e NOR-Partigen®, respectivamente) de acordo com especificações do fabricante (Behring®).

Produção intratecal de imunoglobulinas

A produção intratecal de imunoglobulinas foi avaliada de forma quantitativa através de: porcentagem de gamaglobulinas do LCR^{9,36}; valor absoluto de IgG, IgA e IgM no LCR^{7,20,36}; porcentagem de IgG LCR em relação à proteína total³⁶; relação da IgG LCR com Alb LCR³⁶; quociente das imunoglobulinas^{34,37,38}; índice da imunoglobulina^{19,32,36}; função logarítmica do índice de IgG^{23,36}; síntese diária, intratecal, de IgG³⁸; fórmula de Schuller³¹; função hiperbólica das imunoglobulinas²⁸.

Para distinguir produção intratecal de passagem através da BHE, para cada uma das imunoglobulinas estudadas foi utilizado o gráfico Log/Log, relacionando porcentagem de transferência de albumina com a porcentagem de transferência de cada uma das imunoglobulinas³⁶.

A avaliação qualitativa da produção intratecal de imunoglobulinas foi realizada através de eletroforese em gel de poliácridamida a 10% (PAGE), com e sem redução (Nativo) das proteínas da amostra^{17,36}. A redução

das proteínas da amostra tanto no LCR como no soro foi obtida através do seu tratamento com β mercaptoetanol. As amostras de um mesmo paciente, nos vários períodos do TMO foram colocadas na mesma placa de PAGE. Após eletroforese os géis foram corados por sais de prata¹¹.

Os resultados do PAGE foram confirmados por "immunoblot", realizado tanto com a amostra de forma nativa (gel de poliacrilamida 7%) como com redução (gel de poliacrilamida 10%)¹. O "immunoblot" foi realizado com os seguintes anticorpos: anti IgG humana, cadeia γ específico (DAKO®); anti IgA humana, cadeia α específico (Sigma®); anti IgM humana, cadeia μ específico (Sigma®); anti cadeia leve λ humana (DAKO®); anti cadeia leve κ humana (DAKO®) e conjugado com peroxidase e imunoglobulinas anti-coelho (DAKO®).

As frações protéicas obtidas na eletroforese em gel de poliacrilamida, tanto das placas coradas por sais de prata como das bandas reativas nos "immunoblots", foram identificadas através dos seus pesos moleculares (Sigma® MW- SDS- 200 Kit).

Os géis de poliacrilamida foram analisados no densitômetro ULTROSAN XL LASER- (Pharmacia LKB®), e os pesos moleculares das frações protéicas confirmados.

RESULTADOS

As frações proteicas do LCR na eletroforese em acetato de celulose, encontram-se dentro dos limites normais, nas várias fases do TMO (Tabela 1). Os resultados das dosagens de IgG e IgA no LCR estão indicados nas Tabelas 3 e 5 respectivamente.

Imunoglobulinas séricas

A média de IgG sérica no grupo controle foi 1535 mg/dl (DP 255, Md 1498 mg/dl); no pré TMO foi 1686 mg/dl (DP 422, Md 1628 mg/dl); no pós TMO de 997 mg/dl (DP 346, Md 1020 mg/dl) e durante a DECH-C foi 1490 mg/dl (DP 801, Md 1191 mg/dl).

Com relação à IgA sérica, no grupo controle a média foi 294 mg/dl (DP 124, Md 289 mg/dl); no pré TMO foi 217 mg/dl (DP 106, Md 190 mg/dl); no pós TMO foi 116 mg/dl (DP 50; Md 118 mg/dl); durante a DECH-C foi 107 mg/dl (DP 52; Md 93 mg/dl).

Com relação à IgM sérica, no grupo controle a média foi 240 mg/dl (DP 115; Md 243 mg/dl); no pré TMO foi 265 mg/dl (DP 149; Md 200 mg/dl); no pós TMO foi 124 mg/dl (DP 66; Md 126 mg/dl); durante a DECH-C foi 340 mg/dl (DP 263; Md 226 mg/dl).

Produção intratecal de imunoglobulinas (Tabela 2)

De acordo com o gráfico Log/Log de Thompson, com relação à produção intratecal de IgG, no grupo controle todos os casos se encontravam no quadrante normal. No período pré TMO dois casos mostraram síntese intratecal, no período pós TMO todos os casos se encontravam no quadrante normal, e no período de DECH-C quatro casos apresentaram síntese intratecal, sendo que um deles já apresentava no pré TMO (Gráfico 1).

No período de DECH-C dois casos apresentaram todas as variáveis estudadas, para pesquisa de síntese intratecal de IgG (fórmulas e gráfico), alteradas. Nestes casos, aproximadamente 38% e 57%, da IgG total do LCR foi de síntese intratecal, de acordo com a função hiperbólica de IgG.

Quando analisamos no conjunto, com relação à síntese intratecal de IgG, todos as médias se encontram dentro dos valores normais, com exceção da obtida pela fórmula de Schuller que foi 2,29mg/dl no período de DECH-C (Tabela 3).

Os casos em que houve evidências de síntese intratecal de IgA estão indicados na Tabela 4.

De acordo com o gráfico Log/Log de Thompson, com relação à IgA, no grupo controle dois casos apresentaram síntese intratecal, dois casos no pré TMO, e um no pós TMO. No período de DECH-C nenhum caso apresentou alteração (Gráfico 2).

Em um caso, no grupo controle e outro no pós TMO, todas as variáveis pesquisadas para síntese intratecal de IgA (fórmulas e gráfico) estavam alteradas. De acordo com a função hiperbólica de IgA, respectivamente, 86 e 78% da IgA total do LCR foi de produção intratecal. No período DECH-C não houve evidências de síntese intratecal de IgA por nenhuma das variáveis estudadas.

Tabela 1. Frações protéicas do LCR na eletroforese em acetato de celulose.

	Controle n=30			Pré n=33			Pós n=27			Dech-c n=17		
	X	DP	Md	X	DP	Md	X	DP	Md	X	DP	Md
Pré- albumina	7,01	1,84	6,80	4,64	2,09	4,50	5,48	3,00	4,90	5,82	1,87	5,80
Albumina	57,14	7,00	58,90	62,91	7,43	63,20	61,35	10,91	63,60	59,30	9,36	61,20
α 1 globulina	3,68	1,46	3,60	2,90	1,93	3,40	4,38	2,15	4,00	4,58	1,74	4,90
α 2 globulina	6,12	1,67	5,55	5,36	3,10	4,70	7,25	6,48	5,40	6,39	1,91	6,10
β globulina	10,98	2,83	11,65	11,16	4,69	10,60	10,40	4,07	9,60	10,56	6,41	7,90
Tau	4,12	2,92	3,25	2,17	1,99	2,10	2,01	1,80	2,20	2,28	1,89	2,50
δ globulina	10,72	2,37	10,60	10,75	3,20	10,70	9,14	2,87	8,20	11,06	4,21	12,00

Tabela 2. Avaliação da produção intratecal de IgG no grupo controle e nos períodos Pré, Pós e DECH-C. Porcentagem de casos alterados.

	Controle n=30		Pré n=33		Pós n=27		Dech-c n=17	
	alt.	%	alt.	%	alt.	%	alt.	%
Gama	0	0	4	12,12	1	3,70	3	17,68
IgG	0	0	2	6,06	1	3,70	3	17,68
% IgG lcr/PT lcr	0	0	0	0	0	0	2	11,76
IgG lcr / Alb lcr	0	0	1	3,03	0	0	2	11,76
Q IgG	0	0	1	3,03	3	11,11	3	17,68
Ind. IgG.	1	3,33	4	12,12	2	7,41	4	23,53
Log Ind IgG	1	3,33	4	12,12	1	3,70	4	23,53
F. Tourtellotte	0	0	0	0	0	0	2	11,76
F. Schuller	2	6,67	10	30,30	1	3,70	6	35,29
IgG FH	0	0	3	9,09	5	18,52	5	29,41

Quando analisamos no conjunto, com relação à síntese intratecal de IgA, a média do cálculo da função hiperbólica de IgA, tanto no período pré como pós TMO apresenta-se alterada. Todas as outras variáveis apresentam médias dentro dos limites normais, em cada um dos períodos do TMO (Tabela 5).

Com relação à IgM, a dosagem foi obtida em apenas uma amostra, esta pertencente ao período de DECH-C. A dosagem de IgM, foi 1,45 mg/dl; o quociente de IgM 0,003 e o índice de IgM, 1,41; todos estes valores estão alterados. De acordo com a função hiperbólica de IgM 1,17 mg/dl são de produção intratecal, isto é aproximadamente 81% da IgM total do LCR. No gráfico Log/Log de Thompson este ponto está localizado no quadrante de síntese intratecal.

Avaliação qualitativa: no PAGE com redução das proteínas da amostra ou no estado nativo não houve alteração do padrão eletroforético das amostras (Figs 1 e 2). No PAGE nativo não foram observadas bandas oligoclonais em nenhuma das amostras estudadas (Fig 2). Estes resultados foram confirmados pela reação de "immunoblot".

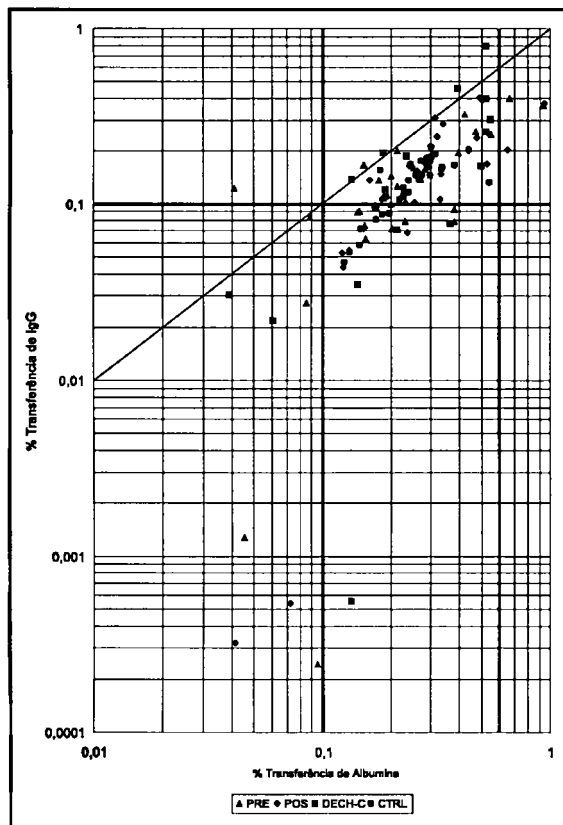


Gráfico 1. Comportamento da IgG do LCR, de acordo com a avaliação da BHE, durante o TMO.

Tabela 3. Avaliação da produção intratecal de IgG no grupo controle e nos períodos Pré, Pós e DECH-C.

	Controle n=30			Pré n=33			Pós n=27			Dech-c n=17		
	X	DP	Md	X	DP	Md	X	DP	Md	X	DP	Md
Gama	10,72	2,37	10,60	10,75	3,19	10,70	9,14	2,86	8,20	11,06	4,21	12,00
IgG	2,03	0,72	2,06	2,25	1,43	1,74	1,68	1,38	1,43	2,76	3,19	1,97
% IgG Icr/PT Icr	8,93	2,77	8,97	7,03	3,89	6,51	5,62	4,19	4,47	7,66	7,93	6,64
IgG Icr / Alb Icr	0,13	0,02	0,13	0,16	0,13	0,13	0,09	0,05	0,10	0,17	0,16	0,13
Q IgG	0,001	0,0004	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001
Ind. IgG	0,53	0,12	0,50	0,60	0,49	0,56	0,51	0,24	0,47	0,60	0,42	0,55
Log Ind. IgG	0,34	0,23	0,31	0,16	1,16	0,42	0,03	1,17	0,24	0,14	1,32	0,40
F. Tourtellotte	-4,69	2,53	-4,74	-5,08	4,89	-4,29	-2,54	3,67	-3,21	-0,84	12,49	-3,65
F. Schuller	1,15	0,74	1,04	1,64	1,91	1,73	-0,10	1,34	-0,06	2,29	3,56	0,59
IgG FH	-0,95	0,57	-0,94	-1,20	1,11	-0,87	-0,65	0,79	-0,68	-0,39	2,47	-0,76

Tabela 4. Avaliação da produção intratecal de IgA no grupo controle e nos períodos Pré, Pós e DECH-C. Porcentagem de casos alterados.

	Controle n=30		Pré n=33		Pós n=27		Dech-c n=17	
	alt.	%	alt.	%	alt.	%	alt.	%
IgA	4	13,33	2	6,06	1	3,70	0	0
Q IgA	2	6,67	2	6,06	1	3,70	0	0
Ind. IgA	4	13,33	6	18,18	2	7,41	0	0
IgA FH	5	16,67	7	21,21	2	7,41	0	0

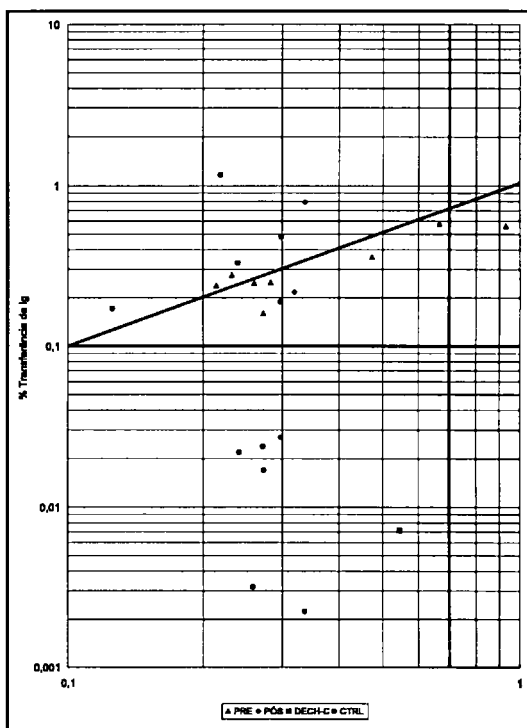


Gráfico 2. Comportamento da IgA, de acordo com a avaliação da BHE, durante o TMO.

Tabela 5. Avaliação da produção intratecal de IgA no grupo controle e nos períodos Pré, Pós e DECH-C.

	Controle n=30			Pré n=33			Pós n=27			Dech-c n=17		
	X	DP	Md	X	DP	Md	X	DP	Md	X	DP	Md
IgA	0,17	0,35	0,00	0,20	0,36	0,00	0,05	0,19	0,00	0,0007	0,003	0,00
Q IgA	0,0008	0,002	0,00	0,0008	0,002	0,00	0,0004	0,001	0,00	4,25E-6	1,75E-5	0,00
Ind. IgA	0,36	1,04	0,00	0,21	0,39	0,00	0,11	0,47	0,00	0,0008	0,003	0,00
IgA FH	-0,04	0,34	0,00	0,07	0,13	0,00	0,03	0,13	0,00	-0,02	0,09	0,00

DISCUSSÃO

SNC é considerado um local imunologicamente privilegiado, que não participa nas reações imunes do resto do organismo². Isso porque no SNC elementos normalmente identificáveis do sistema imunológico são raros ou inexistentes. As moléculas necessárias para a apresentação de antígenos pelo MHC às células T não são expressadas, de forma constitucional, em níveis encontrados na maioria dos outros tecidos^{14,24}. Além disso, a existência de uma barreira funcional, a BHE, impede a difusão de imunoglobulinas, complemento e fatores de coagulação, como também inibe o tráfego de elementos celulares do sistema imunológico¹³. Porém este conceito, tem sido modificado. Após estimulação imunológica sistêmica importante, como a DECH, o SNC passa a expressar características imunológicas que não estavam presentes anteriormente. Desta forma, uma resposta imune específica como expressão de antígenos MHC e infiltração por linfócitos T pode ocorrer no SNC como parte de uma reação imune sistêmica^{14,16}. Uma teoria possível para patogênese da DECH considera que o principal ataque é contra o sistema linforreticular do hospedeiro, e o dano a órgãos não linfóides ocorreria por proximidade à estes tecidos²¹.

O envolvimento direto do SNC pela DECH é assunto controverso, principalmente porque algumas séries avaliando complicações neurológicas no TMO não mostraram evidência de que isso ocorra. Portanto, para vários autores, o SNC não é considerado um órgão alvo²⁷. Existem várias explicações possíveis para o fato da DECH não ocorrer no SNC; este não possui vasos linfáticos, além disso no SNC as características antigênicas necessárias para induzir DECH não estão presentes²⁷. As características comuns das estruturas alvo na DECH são, em primeiro lugar, a habilidade em expressar antígenos HLA-DR, e secundariamente uma alta taxa de regeneração celular³. Estas características não são evidenciadas no SNC normalmente. Porém, observamos que em situações de grande estimulação imunológica os pré requisitos para que ocorra uma resposta imune celular passam a existir, o que de certa forma o tornaria suscetível ao envolvimento direto pela DECH-C^{14,16}.

Várias evidências têm contribuído para modificação do conceito de que o SNC não é um órgão alvo na DECH-C. Em estudos experimentais, através da análise por imuno-histoquímica do SNC, após a indução de DECH, observou-se expressão extensa e forte, em parênquima e vasos, de antígenos MHC classe I e II em todos os níveis do SNC, em associação com linfócitos T ocasionais e difusos. Estes dados indicam que o SNC não somente participa da reação imunológica sistêmica, como também ocorre a presença de um número detectável de linfócitos. Isto ocorre sem evidências de inflamação ou quebra da BHE. Portanto, o isolamento imunológico do SNC parece diminuir ou desaparecer durante uma reação imune sistêmica. A maioria das células do parênquima cerebral, expressando antígenos MHC, parece ser representada por microglia ativada. Assim sendo, na DECH, as condições necessárias para que a resposta imune mediada por células T ocorra, estão presentes no parênquima do SNC. Então torna-se possível que uma reação imune, auto-sustentada, possa se desenvolver, se algum dos linfócitos T infiltrantes, com auxílio de células apresentadoras de antígeno, reconhecerem os constituintes do SNC como antígenos^{14,16}.

Alguns casos relatados procuram relacionar os achados anatomopatológicos no SNC com um envolvimento direto pela DECH-C. Rouah et al.²⁹ relatam um caso em cuja necropsia o SNC mostrou agregados focais mononucleares nas leptomeninges, espaços de Virchow-Robin e parênquima do hipocampo. As similaridades entre os infiltrados no SNC e os encontrados em outros órgãos, assim como a ausência de um agente infeccioso identificável, sugerem que os infiltrados no SNC poderiam estar diretamente relacionados com DECH-C. Marosi et al.²¹ descrevem um caso de DECH-C que evoluiu com sinais de envolvimento de tronco cerebral e morte. O exame do SNC, pós morte, demonstrou infiltrado perivascular difuso, predominantemente linfóide, em meninges e tecido nervoso. Células microgliais ativadas expressavam antígeno HLA-DR, o que normalmente não ocorre no SNC²⁴. Estas alterações histológicas são similares às observadas no SNC em DECH experimental¹⁴. As alterações histopatológicas encontradas no cérebro são similares às encontradas na pele e fígado. Os autores sugerem que este caso representa a primeira documentação do envolvimento do SNC na

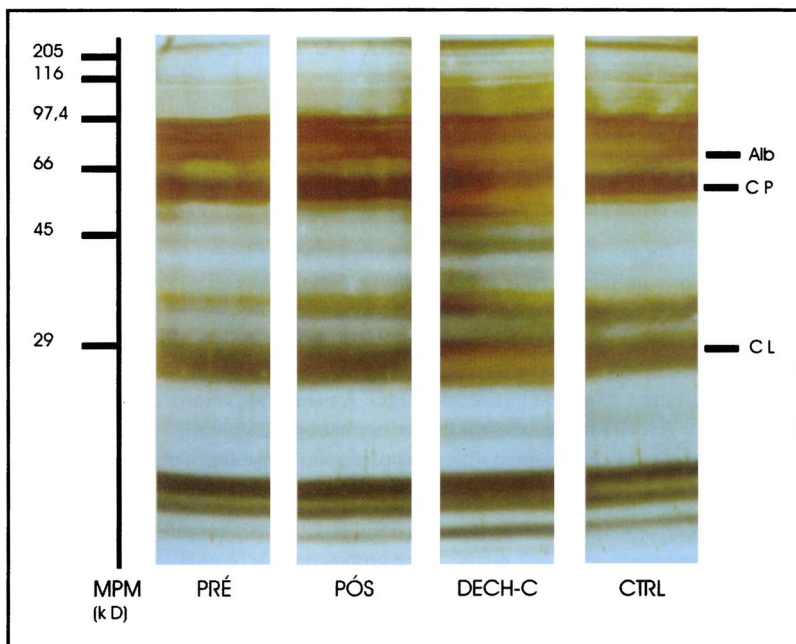


Fig 1. PAGE do LCR com redução das proteínas da amostra. Peso molecular: albumina (Alb) 70,8 kD, cadeia pesada (CP) 56,3 kD, cadeia leve (CL) 20,5 kD.

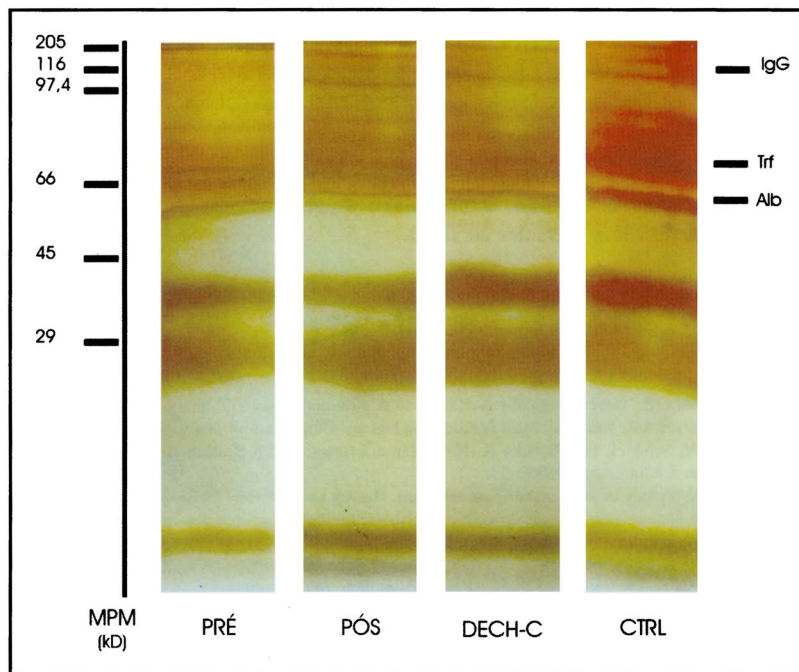


Fig 2. PAGE Nativo do LCR. Peso molecular: IgG 148,3 kD, transferrina (Trf) 79,9 kD, albumina (Alb) 69,9 kD.

DECH-C. Iwasaki et al.¹⁵ descrevem dois casos de panencefalite subaguda, nos quais os sintomas neurológicos são concomitantes com o início da DECH-C, sugerindo forte associação. Em um dos casos há infiltração difusa do parênquima com linfócitos CD3 em substância branca e cinzenta acompanhada de proliferação da micróglia, fortemente expressando antígenos HLA-DR. Houve preponderância de células com fenótipo CD45RB, considerado patognomônico de DECH experimental.

Dos casos relatados com envolvimento direto do SNC na DECH-C apenas dois apresentam estudo do LCR^{15,21}, mas não atentam para a possibilidade de produção intratecal das imunoglobulinas.

Neste estudo foram incluídos apenas pacientes com LMC, pelo fato de não serem estes pacientes submetidos a quimioterapia intratecal e/ou radioterapia, como profilaxia de envolvimento do SNC pela doença de base. O envolvimento de LMC no SNC é extremamente raro e com isso são afastadas causas de quebra da BHE ou síntese intratecal de imunoglobulinas. Isoladamente, alguns casos sugerem síntese intratecal em todas as fases do TMO, mas quando analisamos os resultados em conjunto não encontramos produção intratecal de IgG. A média dos valores calculados na fórmula de Schuller encontra-se discretamente acima do valor normal ($\leq 2,25$ mg/dl)³¹ no período de DECH-C, porém nesta fórmula o valor de albumina sérica é considerado constante, o que pode resultar em erro³⁶.

Graficamente, alguns casos apresentam síntese intratecal de IgG no período de DECH-C. Também não encontramos síntese de IgA na DECH-C; graficamente alguns casos isolados apresentaram síntese intratecal de IgA no pré, pós e grupo controle. A análise qualitativa não mostrou produção oligoclonal de IgG ou IgA.

IgM foi identificada em uma única amostra de LCR, no período de DECH-C. Todos os índices aplicados, neste caso, indicaram síntese intratecal, inclusive o gráfico bilog de Thompson. Isto é bastante lógico, pois não houve quebra de BHE no período de DECH-C. Para que houvesse passagem da IgM através da BHE seria necessária uma quebra importante na BHE, pois a molécula de IgM é grande, possui estrutura pentamérica, peso molecular de 900 kD e diâmetro de 121Å.

As médias de IgG e IgA sérica, em todas as fases do TMO, encontram-se nos limites da normalidade⁴. Porém com relação à IgM, houve aumento no período de DECH-C, estando normal no pré e pós TMO⁴. Diferente do que relatam Shulman et al.³³, que encontraram aumento policlonal de IgG e IgA e IgM.

As alterações nas dosagens de IgG no LCR nas várias fases do TMO, com diminuição no pós e recuperação no período de DECH-C acompanham as alterações séricas e estão de acordo com o esperado pelas características inerentes ao TMO.

Agradecimento - Ao Prof. Dr. Lineu César Wernick.

REFERÊNCIAS

1. Anderton B, Thorpe RC. New methods of analyzing for antigens and glycoproteins in complex mixtures. *Immunol Today* 1980;1:122-127.
2. Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977;25:1-8.
3. Barrett AJ. Graft versus host disease: clinical features and biology. *Bone Marrow Transpl* 1989;4(Suppl 4):18-21.
4. Becker W, Rapp W, Schwick HG, Störk K. Methoden zur quantitativen Bestimmung von Plasmaproteinen durch Immunpräzipitation. *Z Klin Chem* 1968;6:113.
5. Billingham RE. The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* 1966-67;62:21-78.
6. Cohen SB, Hurd ER. Neurological complications of connective tissue and other "collagen-vascular" diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1981;11:190-212.
7. Eickhoff K, Heipertz R. Discrimination of elevated immunoglobulin concentrations in CSF due to inflammatory reaction of the central nervous system and blood-brain-barrier dysfunction. *Acta Neurol Scand* 1977;56:475-482.
8. Ferrara JLM, Deeg HJ. Graft-versus-host disease. *N Engl J Med* 1991;324:667-674.
9. Fishman RA. Cerebrospinal fluid in diseases of the nervous system. Ed 2, Philadelphia:WB Saunders, 1992.
10. Furst DE, Clements PJ, Graze P, Gale R, Roberts N. A syndrome resembling progressive systemic sclerosis after bone marrow transplantation: a model for scleroderma? *Arth Rheum* 1979;22:904-910.
11. Gottlieb M, Chavko M. Silver staining of native and denatured eucaryotic DNA in agarose gels. *Analy Biochem* 1987;165:33-37.

12. Graze PR, Gale RP. Chronic graft versus host disease: a syndrome of disordered immunity. *Am J Med* 1979;66:611-620.
13. Hickey WF. Microglial participation in the initiation of CNS inflammation. *Disc Neurosc* 1993;9:74-78.
14. Hickey WF, Kimura H. Graft vs. host disease elicits expression of class I and class II histocompatibility antigens and the presence of scattered T lymphocytes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:2082-2086.
15. Iwasaki Y, Sako K, Ohara Y, Miyazawa M, Minegishi M, Tsuchiya S, Konno T. Sub acute pan encephalitis associated with chronic graft-versus-host disease. *Acta Neuropathol* 1993;85:566-572.
16. Kajiwara K, Hirozane A, Fukumoto T, Orita T, Nishizaki T, Kamiryo T, Ito H. Major histocompatibility complex expression in brain of rats with graft-versus-host disease. *J Neuroimmunol* 1991;32:191-198.
17. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
18. Lawley TJ, Peck GL, Moutsopoulos HM, Gratwohl AA, Deisseroth AB. Scleroderma, Sjögren-like syndrome, and chronic graft-versus-host disease. *Ann Intern Med* 1977;87:707-709.
19. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders: II. Relation of the concentration of the proteins in serum and cerebrospinal fluid. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:391-396.
20. Livramento JA. Imunoglobulinas do liquido cefalorraqueano normal: II. Relações e índices. *Arq Neuropsiquiatr* 1979;37:397-404.
21. Marosi C, Budka H, Grimm G, Zeithofer J, Sluga E, Brunner C, Schneeweiss B, Volc B, Bettelheim P, Panzer S, Kier P, Graninger W, Haas OA, Hinterberger W. Fatal encephalitis in a patient with chronic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transpl* 1990;6:53-57.
22. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Haematopoietic chimera in man after allogeneic (homologous) bone-marrow transplantation: control of the secondary syndrome. Specific tolerance due to the chimerism. *Br Med J* 1963;28:1633-1635.
23. McLean BN, Luxton RW, Thompson EJ. A study of immunoglobulin G in the cerebro-spinal fluid of 1007 patients with suspected neurological disease using isoelectric focusing and the log Ig G- index. *Brain* 1990;113:1269-1289.
24. Morris A, Hewitt C, Young S. Control of the expression of genes for histocompatibility antigens. (The major histocompatibility complex: its genes and their roles in antigen presentation). *Molec Aspects Med* 1994;15:411-423.
25. Openshaw H, Slatkin NE. Neurological complications of bone marrow transplantation. In Forman SJ, Blume KG, Thomas ED (eds). *Bone marrow transplantation*. Boston: Blackwell, 1994:482-96.
26. Parkman R. Clonal analysis of murine graft-vs-host disease: I. Phenotypic and functional analysis of T lymphocyte clones. *J Immunol* 1986;136:3543-3547.
27. Patchell RA, White III CL, Clark AW, Beschoner WE, Santos GW. Neurologic complications of bone marrow transplantation. *Neurology* 1985;35:300-306.
28. Reiber H, Felgenhauer K. Protein transfer at the blood cerebrospinal fluid barrier and the quantitation of the humoral immune response within the central nervous system. *Clin Chim Acta* 1987;163:319-328.
29. Rouah E, Gruber R, Shearer W, Armstrong D, Hawkins EP. Graft-versus-host disease in central nervous system: a real entity? *Am J Clin Pathol* 1988;89:543-546.
30. Santos GW. History of bone marrow transplantation. *Clin Haematol* 1983;12:611-639.
31. Schuller E, Sagar HJ. Local synthesis of CSF immunoglobulins: a neuroimmunological classification. *J Neurol Sci* 1981;51:361-370.
32. Sharief MK, Thompson EJ. Intrathecal immunoglobulin M synthesis in multiple sclerosis: relationship with clinical and cerebrospinal fluid parameters. *Brain* 1991;114:181-195.
33. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, Hackman R, Tsoi M, Storb R, Thomas ED. Chronic graft-versus-host syndrome in man: a long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med* 1980;69:204-217.
34. Sindic CJM, Cambiaso CL, Depré A, Laterre EC, Masson PL. The concentration of IgM in the cerebrospinal fluid of neurological patients. *J Neurol Sci* 1982;55:339-350.
35. Sullivan KM. Graft-versus-host disease. In Forman SJ, Blume KG, Thomas ED (eds). *Bone marrow transplantation*. Boston: Blackwell, 1994:339-362.
36. Thompson EJ. *The CSF proteins: a biochemical approach*. Amsterdam: Elsevier, 1988.
37. Tibbling G, Link H, Öhman S. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. I. Establishment of reference values. *Scand J Clin Lab Invest* 1977;37:385-390.
38. Tourtellotte WW. On cerebrospinal fluid immunoglobulin-G (IgG) quotients in multiple sclerosis and other diseases: a review and a new formula to estimate the amount of IgG synthesized per day by the central nervous system. *J Neurol Sci* 1970;10:279-304.
39. Van Bekkum DW. What is graft versus host disease? *Bone Marrow Transpl* 1991;7(Suppl 2):110-111.
40. Wiznitzer M, Packer RJ, August CS, Burkey ED. Neurological complications of bone marrow transplantation in childhood. *Ann Neurol* 1984;16:569-576.