

SUBPOPULAÇÕES LINFOCITARIAS DO LIQUIDO CEFALORRAQUEANO

III. VALORES NORMAIS

L. R. MACHADO *

A avaliação do significado das alterações no perfil citomorfológico e, em particular, nos contingentes linfocitários do líquido cefalorraqueano (LCR) em doenças inflamatórias do sistema nervoso central (SNC) apresenta uma série de dificuldades. Como se depreende de extensa revisão bibliográfica feita anteriormente, uma das mais importantes é a falta de padronização adequada de valores representativos da população normal¹¹. Decorre isto em grande parte da utilização de métodos inadequados para o estudo de amostras oligocelulares e, por outro lado, da inadequada seleção do material considerado para caracterização da normalidade. Considerando esses óbices, foi descrita metodologia adequada ao estudo de amostras oligocelulares, como é o caso do LCR normal¹².

A adequada caracterização de valores representativos da normalidade para as subpopulações do LCR normal constitui o objeto deste trabalho.

MATERIAL E METODOS

O estudo das subpopulações de linfócitos T e B no LCR foi efetuado em uma amostra de cada um de 50 pacientes com cefaléia crônica. Em todos eles não havia qualquer alteração do exame clínico e do exame neurológico; 33 eram do sexo feminino; suas idades variavam entre 12 e 56 anos (média 31,5); 41 eram brancos, 1 era amarelo e 8, pardos ou pretos.

Todos os pacientes apresentavam quadro geral do LCR da cisterna magna (punção suboccipital) dentro dos limites normais, caracterizado mediante o estudo da amostra na qual foi efetuada a presente pesquisa e segundo os parâmetros conceituados para tanto²². Assim, todas as amostras eram límpidas e incolores e não apresentavam hemácias. De suas características, a média (\bar{x}) e o desvio padrão (s) são os seguintes: pressão inicial (cm de água) $\bar{x} = 11,4$, $s = 2,78$; pressão final (após retirada de 10 ml de LCR) $\bar{x} = 5,3$, $s = 2,17$; número de células (leucócitos/mm³) $\bar{x} = 0,5$, $s = 0,33$; proteínas totais (mg/dl) $\bar{x} = 20,1$, $s = 4,02$; cloretos (mg/dl): $\bar{x} = 706,7$, $s = 17,72$; glicose (mg/dl) $\bar{x} = 65,1$, $s = 6,61$. As

Trabalho (Dissertação de Mestrado: terceira parte) do Centro de Investigações em Neurologia da Clínica Neurológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo: * médico assistente.

reações para globulinas (reação de Pandy, reação de Nonne-Appelt e reação coloidal de Takata-Ara) eram negativas em todas as amostras; reações imunológicas para sífilis (reação de fixação do complemento de Wassermann; reação de floculação do VDRL) e para cisticercose (reação de fixação do complemento de Weinberg) eram não reagentes em todas as amostras. As características citomorfológicas também se encontravam dentro dos limites da normalidade¹³ e suas estimativas constam da tabela 1.

	L	Lm	RM	RMn	L+Lm	RM+RMn
\bar{x}	64,7	4,8	25,9	4,7	69,4	30,6
s	2,25	1,29	1,90	1,60	1,80	1,78
\bar{S}_x	0,32	0,18	0,27	0,23	0,25	0,25
$\bar{x} \pm s.t.$	64,7 \pm 4,5	4,8 \pm 2,6	25,9 \pm 3,8	4,7 \pm 3,2	69,4 \pm 3,6	30,6 \pm 3,6

Tabela 1 — Perfil citomorfológico (%) das 50 amostras de LCR, suas estimativas (\bar{x} , média; s, desvio padrão) e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t.$) para $p = 0,05$. Para os tipos celulares: L = linfócitos; RM = reticulomonócitos; m = células modificadas e/ou ativadas.

No material assim caracterizado foi feito o estudo da subpopulação B e das subpopulações T segundo as técnicas descritas anteriormente¹².

A análise estatística do material foi feita depois de caracterizada como normal a distribuição citomorfológica, a de linfócitos B, a de linfócitos T e a de linfócitos T-ativos, bem como as dos subgrupos caracterizados segundo a afinidade por hemácias de carneiro para as subpopulações T e T-ativa. Nos testes de significância foi utilizado o teste t de Student, aceitando $\alpha = 0,05$. Os cálculos referentes à análise de variância foram dispostos em tabelas com fator global de variação = 1 sendo $\alpha = 0,05$. Os testes de covariância e correlação segundo Pearson foram realizados entre duas variáveis, consideradas caso a caso, para cada subgrupo analisado.

RESULTADOS

As estimativas das populações celulares do LCR são apresentadas em tabelas também: linfócitos B (tabela 2); linfócitos T (tabela 3); linfócitos T-ativos (tabela 4); subpopulações de linfócitos T conforme sua afinidade por hemácias de carneiro (tabela 5); contingente de linfócitos T-ativos consoante o número de hemácias agregadas à superfície celular (tabela 6); contingente de linfócitos ávidos, consideradas no grupo de linfócitos T e T-ativos (tabela 7); contingente de linfócitos T-sensibilizados (tabela 8). As estimativas referentes às populações de não-linfócitos são apresentadas na tabela 9, conforme se trate de reticulomonócitos ao exame citomorfológico ou de não-linfócitos ao exame direto nas preparações para determinação de subpopulações B (zimosan), T (rosáceas T) ou T-ativa (rosáceas T-A). Nelas constam os resultados

Estimativa	Não-linfócitos	Linfócitos	
		B	não-B
\bar{x}	29,6	7,0	93,0
s	1,47	1,44	1,58
$S\bar{x}$	0,21	0,20	0,22
$\bar{x} \pm s.t.$	29,6 \pm 3,0	7,0 \pm 2,9	93,0 \pm 3,2

Tabela 2 — Linfócitos B (%): estimativas (\bar{x} , média; s, desvio padrão; $S\bar{x}$ desvio da média) e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t.$) para $p = 0,05$. Número de células estudadas em cada amostra: $x = 174,9$; $s = 12,74$.

Estimativa	Não-linfócitos	Linfócitos	
		T	não-T
x	29,8	76,0	24,0
s	2,67	2,92	2,91
$S\bar{x}$	0,38	0,41	0,41
$\bar{x} \pm s.t.$	29,8 \pm 5,4	76,0 \pm 5,9	24,0 \pm 5,8

Tabela 3 — Linfócitos T (%): estimativas e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t.$) para $p = 0,05$. Número de células estudadas em cada amostra: $\bar{x} = 171,4$; $s = 13,47$.

Estimativa	Não-linfócitos	Linfócitos	
		T-ativos	não T-ativos
\bar{x}	30,0	53,7	46,3
s	1,65	3,26	3,26
$S\bar{x}$	0,23	0,46	0,46
$\bar{x} \pm s.t.$	30,0 \pm 3,3	53,7 \pm 6,6	46,3 \pm 6,6

Tabela 4 — Linfócitos T-ativos (%): estimativas e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t.$) para $p = 0,05$. Número de células estudadas em cada amostra: $\bar{x} = 178,1$; $s = 18,03$.

Estimativa	Hemácias de carneiro agregadas						
	3	4	5	6	7	8	9
\bar{x}	8,2	8,5	8,8	8,8	8,3	8,3	6,1
s	2,25	2,49	1,81	1,55	1,88	2,06	1,50
$S\bar{x}$	0,32	0,35	0,26	0,22	0,27	0,29	0,21
$\bar{x} \pm s.t.$	8,2 \pm 4,5	8,5 \pm 5,0	8,8 \pm 3,6	8,8 \pm 3,8	8,3 \pm 3,8	8,3 \pm 4,1	6,1 \pm 3,0

Tabela 5 — Subpopulações de linfócitos T consoante sua afinidade por hemácias de carneiro, excluindo-se a subpopulação T-ávida (≥ 10 hemácias por linfócito): estimativas e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t.$) para $p = 0,05$.

Estimativa	Hemácias de carneiro agregadas						
	3	4	5	6	7	8	9
\bar{x}	6,9	6,9	6,9	7,2	5,7	5,4	3,7
s	1,94	1,71	1,54	1,68	1,42	1,71	1,15
$S\bar{x}$	0,27	0,24	0,22	0,24	0,20	0,24	0,16
$\bar{x} \pm s.t.$	6,9 \pm 3,9	6,9 \pm 3,4	6,9 \pm 3,1	7,2 \pm 3,4	5,7 \pm 2,9	5,4 \pm 3,4	3,7 \pm 2,3

Tabela 6 — Subpopulações de linfócitos T-ativos consoante sua afinidade por hemácias de carneiro, excluindo-se a subpopulação T-ávida (≥ 10 hemácias por linfócito): estimativas e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t.$) para $p = 0,05$.

Estimativa	T	T-ativos
\bar{x}	19,2	11,1
s	4,32	2,04
$S\bar{x}$	0,61	0,29
$\bar{x} \pm s.t.$	19,2 \pm 8,7	11,1 \pm 4,1

Tabela 7 — Linfócitos T-ávidos: estimativas e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t.$) para $p = 0,05$.

Estimativa	T	T-ativos	T-sensibilizados
\bar{x}	76,0	53,7	22,3
s	2,92	3,26	3,95
\bar{Sx}	0,41	0,46	0,56
$\bar{x} \pm s.t$	76,0 \pm 5,9	53,7 \pm 6,6	22,3 \pm 7,9

Tabela 8 — Linfócitos T-sensibilizados: estimativas e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t$) para $p = 0,05$.

Estimativa	Exame citomorfológico reticulomonócitos	Zimosan não-linfócitos	Rosáceas T não-linfócitos	Rosáceas T-A não-linfócitos
\bar{x}	30,6	29,6	29,8	30,0
s	1,78	1,47	2,67	1,65
\bar{Sx}	0,25	0,21	0,38	0,23
$\bar{x} \pm s.t$	30,6 \pm 3,6	29,6 \pm 3,0	29,8 \pm 5,4	30,0 \pm 3,3

Tabela 9 — Não-linfócitos: estimativas e limites fiduciais ($\bar{x} \pm s.t$) para $p = 0,05$.

quanto à média, ao desvio padrão, ao desvio da média e aos limites fiduciais para probabilidade de $p = 0,05$.

A análise da variância das subpopulações de linfócitos T e T-ativos consta das tabelas 10 e 11, respectivamente. Nessa análise foram excluídas as subpopulações T-ávidas. É considerada hipótese nula a similaridade entre os diversos subgrupos, separadamente para o contingente T (tabela 10) e para o contingente T-ativo (tabela 11).

Na tabela 12 é apresentada a análise de variância das populações de não linfócitos caracterizada pelo método citomorfológico, das rosáceas T e das rosáceas T-ativas. É considerada hipótese nula a similaridade de valores, caso a caso.

Na tabela 13 são apresentadas a covariância e a correlação entre a subpopulação de linfócitos T e a subpopulação de linfócitos T-ativos, quanto à afinidade por hemácias de carneiro.

Os valores do teste de significância para a correlação entre os linfócitos T e os T-ativos são apresentados na tabela 14.

Consta da tabela 15 o teste de significância para os contingentes de linfócitos ávidos nas subpopulações de linfócitos T e T-ativos.

Fonte de variação	Casos «variação explicada»	Afinidade por hemácias «variação não explicada»	Total
Varição: soma de quadrados	264,87	1346,38	1611,25
Graus de liberdade	6	343	349
Variância: soma média de quadrados	44,15	3,93	
Razão F		11,25	
F crítico		2,12	

Tabela 10 — Análise de variância. Subpopuações de linfócitos T classificadas segundo sua afinidade por hemácias de carneiro, excluindo-se a subpopulação T-ávida (≥ 10 hemácias por linfócito).

Fonte de variação	Casos «variação explicada»	Afinidade por hemácias «variação não explicada»	Total
Varição: soma de quadrados	471,57	908,59	1380,16
Graus de liberdade	6	343	349
Variância: soma média de quadrados	78,60	2,65	
Fazão F		28,67	
F crítico		2,12	

Tabela 11 — Análise de variância: subpopulações de linfócitos T-ativos classificadas segundo sua afinidade por hemácias de carneiro, excluindo-se a subpopulação T-ávida (≥ 10 hemácias por linfócito).

Fonte de variação	Casos «variação explicada»	Afinidade por hemácias «variação não explicada»	Total
Varição: soma de quadrados	28,77	760,32	789,09
Graus de liberdade	3	196	199
Variância: soma média de quadrados	9,59	3,88	
Razão F		2,47	
F crítico		2,65	

Tabela 12 — Análise de variância: não linfócitos, considerados segundo sua caracterização pelos métodos de Suta, do zimosan, das rosáceas T e das rosáceas T-A com hemácias de carneiro.

	Afinidade por hemácias de carneiro							
	3	4	5	6	7	8	9	≥ 10
Covariância	+0,671	-0,358	-0,029	+0,007	-0,340	+0,115	+0,114	+1,237
Correlação	+0,154	-0,084	-0,010	+0,003	-0,128	+0,032	+0,066	+0,143

Tabela 13 — Covariância e correlação segundo a afinidade por hemácias de carneiro nos subgrupos de linfócitos T e T-A.

	Afinidade por hemácias de carneiro							
	3	4	5	6	7	8	9	≥ 10
Teste t	1,08	0,58	0,07	0,02	0,89	0,22	0,46	1,00
Graus de liberdade	48	48	48	48	48	48	48	48
t crítico	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68	1,68

Tabela 14 — Teste de significância: correlação segundo afinidade por hemácias de carneiro nos subgrupos de linfócitos T e T-A. É considerada como hipótese nula a não existência de correlação.

	\bar{x}	s	Teste t	t crítico
Linfócitos T	19,2	4,32	11,91	1,67
Linfócitos T-A	11,1	2,04		

Tabela 15 — Teste de significância: subpopulações de linfócitos T-ávidos nos contingentes de linfócitos T e T-A. É considerada hipótese nula a igualdade das médias.

COMENTARIOS

Caracterização da Normalidade das Amostras de LCR Estudadas — O exame do LCR apresenta indicações precisas e restritas. Isto resulta na impossibilidade de contar com amostras colhidas de pessoas normais. Por esse motivo, quase sempre, é necessário estudar amostras obtidas de pacientes cujos processos patológicos não são acompanhados de alterações do LCR. Nos grupos controle ou de referência caracterizados nos estudos sobre subpopula-

ções linfocitárias no LCR não são devidamente delineadas as características de normalidade das amostras de LCR, na maioria dos registros. Este aspecto da questão foi considerado essencial e tornou-se motivo da criteriosa seleção adotada neste estudo.

Assim, os 50 casos selecionados para a investigação apresentavam como queixa clínica, apenas cefaléia. Esta era crônica e não se acompanhava de qualquer alteração do exame clínico e do exame neurológico e todos apresentavam as características gerais do LCR dentro dos limites normais, segundo padronização aceita em nosso meio para LCR colhido mediante punção suboccipital²². Por outro lado, houve o cuidado de caracterizar a análise citomorfológica do LCR como estando dentro dos limites da normalidade^{13,23}.

Como todos esses dados caracterizam a normalidade imunológica dos casos, o critério de seleção adotado permite aceitar a validade dos resultados obtidos quanto às subpopulações de linfócitos do LCR.

Frente à metodologia atualmente disponível e ao pequeno contingente de outras subpopulações linfocitárias do LCR, explica-se a razão de restringir-se este estudo aos contingentes B e T.

Conceituação de Valores para a Subpopulação de Linfócitos B — As estimativas dos valores percentuais, para linfócitos B, foram: média 7,0 e desvio padrão 1,44 (tabela 2).

Embora não haja na literatura registro do uso de metodologia semelhante, alguns autores realizaram estudos de determinação de receptores para C_3 em linfócitos, utilizando hemácias bovinas na presença de anticorpos da classe IgG e complemento^{14,15,16}.

A semelhança do que ocorre em determinação da percentagem de linfócitos B no sangue periférico, os resultados variam muito, sobretudo em função da metodologia empregada e da interpretação dos achados laboratoriais.

A análise cuidadosa dos dados registrados na literatura permite duas considerações principais. A primeira refere-se à similaridade de resultados quando comparados grupos controle a grupos de pacientes com patologia definida. O mesmo ocorre na comparação entre diversos tipos de patologias, mesmo quando, numa delas, há, manifestamente, imunoprodução local. Tal fato, até certo ponto surpreendente, é corroborado pelos estudos sobre cooperação celular na resposta imune em patologias do grupo gama, indicando desequilíbrio da função reguladora sobre o contingente B e não uma hipertrofia primária deste mesmo contingente. A segunda diz respeito à crítica metodológica. O único marcador específico para linfócitos B é a detecção de IgG na membrana celular. O emprego da imunofluorescência direta, usando como conjugado anticorpos da classe IgG, proporciona grande sensibilidade metodológica. No entanto, devido à presença de IgG extrínseca aderida à parede de outras células, a precisão do método é baixa. Por outro lado, o uso da fração (Fab')₂, como conjugado, aumenta a precisão à custa de uma drástica redução na sensibilidade do método. É o que se verifica na análise dos

valores referidos por Kam-Hansen e col.: a mediana dos resultados para linfócitos B no LCR é 4,0 se considerado o grupo de referência, mas a análise do histograma dos resultados revela estar a maioria dos valores próxima a zero ⁸.

Essas considerações permitem comparar os valores obtidos neste estudo aos relatados na literatura, embora, nesta, a maioria dos resultados tenha sido descrita em doentes com processos agudos ou crônicos do SNC. Desta comparação resulta estarem as determinações de linfócitos B no LCR aqui referidos dentro dos limites conceituados para tanto na literatura, isto é, abaixo dos níveis descritos para esta subpopulação no sangue periférico. É necessário realçar ainda o fato de ser este o único método até agora descrito cujos valores obedecem à distribuição normal e apresentam baixos níveis de dispersão.

Ao contrário do que ocorre com os valores resultantes do mapeamento de receptores Fc e da detecção de C₃ por outros métodos como marcadores de linfócitos B no LCR, os resultados mostrados neste trabalho situam-se na faixa intermediária entre as determinações que utilizam a IgG e as determinações que empregam a fração Fab ou (Fab')₂ como conjugados na reação de imunofluorescência direta, ambas caracterizadas pelo desequilíbrio entre precisão e sensibilidade metodológicas.

Conceituação de Valores para a Subpopulação de Linfócitos T — Os linfócitos T foram quantificados utilizando como marcador a presença de receptores para hemácias de carneiro. As estimativas dos resultados percentuais obtidos foram: média 76,0 e desvio padrão 2,92 (tabela 3).

Estes resultados aproximam-se dos relatados por Moser e col.¹⁹, Naess e col.²⁰ e Czlonwska e col.⁴, para pacientes com sintomatologia leve de fundo emocional e com exame neurológico e do LCR referidos como normais. Diferem, no entanto, de modo significativo, dos observados por Manconi e col.^{14,15,16} num grupo de pacientes com exame do LCR dito normal. No entanto, estes pacientes apresentavam alterações neurológicas ou psiquiátricas orgânicas definidas, pelo que devem ser considerados com restrições como grupo controle.

No estudo do comportamento do contingente T em patologia predominam os registros sobre esclerose múltipla, dado o caráter imunológico da doença e dadas as dificuldades envolvidas no diagnóstico clínico e laboratorial. Alguns autores admitem que os pacientes com esta afecção apresentam aumento da subpopulação T. Entre eles são de mencionar Naess col.²⁰ e Czlonkowska e col.⁴. Por outro lado, Manconi e col.⁴ e Kam-Hansen e col.⁸ não encontraram diferença significativa entre pacientes com esclerose múltipla e grupos de referência constituídos de pacientes com outras doenças do sistema nervoso, no que diz respeito à subpopulação de linfócitos T.

Por análise de confronto, comparados grupos de patologias do sistema nervoso entre si e relativamente a grupos de referência, pode verificar-se que as diferenças na determinação da subpopulação de linfócitos T no LCR, por vezes explicitamente admitidas, perdem expressividade e consistência ao serem

pareados com valores obtidos por grupos de pesquisadores trabalhando com pacientes semelhantes e com métodos em tudo comparáveis.

É possível que, à semelhança do que ocorre com os linfócitos B, o contingente de linfócitos T, como tal, não se altere em patologia. Dos estudos sobre produtos dos genes de histocompatibilidade e sua influência na cooperação celular pode concluir-se que, na maioria das vezes, as alterações patológicas se fundamentam no desequilíbrio entre subclasses de linfócitos T.

É possível mesmo que as alterações no contingente T registradas em alguns estudos sejam apenas o reflexo de alterações em suas subclasses que, por algum motivo, ganham expressividade maior em determinados grupos de pacientes e em condições técnicas particulares.

Torna-se, assim, imperativa a análise de subclasses de linfócitos T que possam traduzir com maior clareza alterações da resposta imune, clinicamente observáveis em diversas afecções, em especial nas de natureza inflamatória e infecciosa.

Conceituação de Valores para a Subclasse de Linfócitos T-Ativos — Os valores percentuais para linfócitos T-A foram: média 53,7 e desvio padrão 3,26 (tabela 4).

A subclasse de linfócitos T-A foi conceituada como um contingente linfocitário cujos receptores guardam afinidade por hemácias de carneiro em condições subótimas, sendo por isso considerado o contingente imunologicamente mais ativo. Tal conceituação é vagamente sugerida pelo paralelismo entre a imunidade celular expressa no teste do PPD e a presença de aumento do contingente T-A⁵.

Embora não se conheçam as funções das células T-A, em condições clínicas de imunoprodução local, como na esclerose múltipla, seria de se esperar um aumento do contingente T-A de algum modo proporcionado à exacerbação da resposta imune. No entanto, pacientes com esta afecção apresentam níveis drasticamente diminuídos comparativamente aos que ocorrem nas meningites assépticas. Têm sido consideradas várias possibilidades na tentativa de explicar o fenômeno⁷. (1) A baixa percentagem de células T-A na esclerose múltipla representa os níveis normais, ocorrendo na meningite asséptica um aumento agudo da atividade imunológica. (2) Pacientes com esclerose múltipla apresentam um defeito na imunocompetência e, por isso, são incapazes de recrutar células T-A para o SNC. (3) As células T-A fixam-se às placas de desmielinização da esclerose múltipla e o exame do LCR não é representativo. (4) As células T-A representam um estágio de amadurecimento dos linfócitos T; linfócitos mais velhos apresentam maior quantidade de ácido siálico na membrana, e sua remoção, pelo uso de neuraminidase, aumenta a percentagem de rosáceas T; estudos sobre esta subpopulação no sangue periférico mostram sua constância no tempo, indicando haver um "turnover" definido destas células. (5) Os linfócitos do LCR nos pacientes com esclerose múltipla podem ser modificados por vírus, ou apresentar antígenos de histocompatibilidade peculiares, com alterações nos receptores de membrana só demonstráveis em condições sub-ótimas.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem descartar a primeira hipótese. A segunda hipótese é bastante improvável, pois estabelece para as células T-A uma função chave na transferência da resposta imune da economia sistêmica para o SNC, desconsiderando os estudos sobre auto-imunidade e produção local na esclerose múltipla. A terceira hipótese constitui uma explicação "ad hoc", inviabilizando o conhecimento auferido dos achados de citologia do LCR em doenças inflamatórias, tornando-se dificilmente aceitável. A quarta e a quinta hipóteses partem do pressuposto de ocorrer uma possível relação não direta, ou mesmo inversa, entre os níveis de T-A e imunoprodução. Tal possibilidade será considerada a seguir.

É sabido que, na esclerose múltipla e em outras doenças crônicas do SNC, especialmente naquelas que resultam em imunoprodução ou imunoliberação local, há sensibilização dos linfócitos contra uma série de antígenos ou haptenos do SNC, especialmente a proteína básica da mielina^{2,9}.

Por outro lado, como já foi dito, na resposta imunológica específica ocorre o fenômeno de restrição de histocompatibilidade. Isto significa que apenas os linfócitos T sensibilizados contra o antígeno e que possuem antígenos de histocompatibilidade semelhantes na membrana podem interagir para a produção da resposta imune. A ativação do receptor deve ser, portanto, dupla e só ocorre em determinadas condições. Uma delas depende do modo de apresentação do antígeno, que deve estar aderido à parede do macrófago com antígenos de histocompatibilidade semelhantes aos do linfócito T a ser estimulado. Antígenos solúveis são incapazes de ativar corretamente o receptor por não possuírem receptores para MHC associados. Outra condição importante é a temperatura. A estimulação dos receptores ocorre a 37°C e é anulada a 4°C. Uma vez que haja o fenômeno de acoplamento antígeno-receptor, produz-se um bloqueio destes receptores e as células T passam a não responder a qualquer outro estímulo. Este fenômeno é conhecido como suicídio de células T sensibilizadas¹⁸.

Em condições normais ocorre a presença de reticulomonócitos modificados no sistema LCR, constituindo-se em contingente capaz de interagir imunologicamente. A ocorrência de antígenos e haptenos do SNC em pessoas normais, embora em títulos baixos como acontece com a proteína básica da mielina, faz supor que existam linfócitos sensibilizados contra estes antígenos em condições normais¹⁰. É também sabido que, em doenças de natureza auto-imune, como na esclerose múltipla, existem perturbações no sistema de tolerância imunológica, de modo a ocorrer desequilíbrio entre as subpopulações T-reguladoras, ocasionando hipofunção de células supressoras e a conseqüente liberação do contingente imunoprodutor. Nestas condições é de se esperar que o contingente de linfócitos T sensibilizados esteja aumentado, correspondendo a títulos maiores de antígenos do SNC detectáveis no LCR.

Se as células T-A são aquelas que apresentam correlação positiva com a imunidade celular, seria de se esperar que os seus valores estivessem aumentados em doenças nas quais sabidamente há sensibilização linfocitária específica aumentada. No entanto, se se considerar o fenômeno do bloqueio de receptores das células T especificamente determinadas, esses receptores só

serão mapeáveis a temperaturas baixas, permanecendo bloqueados a 37°C. Assim sendo, a incubação a 37°C por uma hora, não seguida de incubação em mistura água-gelo, proporcionaria as condições ideais para ocorrer o fenômeno do bloqueio de receptores, já que existem, mesmo em condições normais, antígenos do SNC e células do sistema reticulonocitário em condições de atividade imunológica.

Desse modo, o método de determinação de linfócitos T-A proposto por Wybran e Fudenberg não determinaria realmente os linfócitos T imunologicamente mais ativos, mas sim os linfócitos T com receptores disponíveis na membrana, após o bloqueio de receptores dos linfócitos sensibilizados. Estes constituiriam a população complementar à dos linfócitos T-A, isto é, a população que se situa entre aquela quantificada pelo método de Wybran e Fudenberg e a quantificada pelo método clássico. Esta última, devido à incubação em mistura água-gelo por duas horas, proporcionaria condições de liberação de todos os receptores de superfície das células T, incompletamente bloqueados por incubação a 37°C por apenas 5 minutos. Este fato é corroborado pelos achados de Bach, que refere não haver influência considerável do tempo de incubação de linfócitos a 37°C desde 5 minutos até uma hora, na contagem de linfócitos T clássica, desde que haja incubação posterior a 0°C por período mínimo de duas horas¹.

Admitidas estas premissas, seria possível concluir que, na esclerose múltipla, o contingente T sensibilizado ou ativado é maior do que nos pacientes com cefaléia crônica, objeto deste trabalho. Este contingente T sensibilizado ou ativado seria representado pela diferença entre o número de linfócitos T e o número de linfócitos T-A em cada caso. As estimativas para os valores assim obtidos (média e desvio padrão) foram: média 22,3 e desvio padrão 3,95 (tabela 8).

Conceituação de Valores para as Subclasses de Linfócitos T-Ávidos — O fenômeno de avidéz de linfócitos T é quantificado pelo número de hemácias aderidas à membrana linfocitária. São considerados linfócitos T-ávidos aqueles que apresentam 10 ou mais hemácias agregadas à sua superfície. A determinação de linfócitos T-ávidos parte do pressuposto de que o número de hemácias guarda correlação com o número de receptores disponíveis na membrana celular.

Neste estudo foi considerado o número de hemácias aderidas a cada um dos linfócitos T, previamente conceituados como aqueles que apresentam três ou mais hemácias agregadas. Foram obtidos 8 grupos de linfócitos, de acordo com esse critério. No estudo estatístico foi considerado separadamente o grupo conceituado como T-ávido. As estimativas e limites fiduciais para os 7 grupos com afinidade variável por hemácias de carneiro na subpopulação T e na subpopulação T-A são referidos, respectivamente, nas tabelas 5 e 6.

As estimativas dos valores para a subpopulação T-ávida no contingente T foram: média 19,2 e desvio padrão 4,32. As estimativas dos valores da subpopulação T-ávida no contingente T-A foram: média 11,1 e desvio padrão 2,04 (tabela 7).

A análise de variância relativa à afinidade de linfócitos T por hemácias de carneiro, referida na tabela 10, mostra que a distribuição de hemácias entre os elementos das subpopulações T não é aleatória, podendo ser condicionada por fatores que agem diferentemente sobre cada um dos grupos. O mesmo ocorre na subpopulação T-A, conforme dados assinalados na tabela 11.

Por outro lado, os valores obtidos da quantificação da afinidade por hemácias em cada um dos 7 grupos de linfócitos T, quando comparados a grupos semelhantes na subpopulação T-A, não são covariantes, e não guardam correlação, conforme é referido nas tabelas 13 e 14. Os mesmos resultados foram obtidos para a subpopulação T-ávida nas células T e para a subpopulação T-ávida nas células T-A, conforme é mostrado na tabela 15.

Estes dados mostram que as subpopulações T e T-A são contingentes linfocitárias diferentes quanto à densidade de receptores para hemácias de carneiro, evidenciada pelo fenômeno de avidéz.

Formas Linfocitárias Modificadas — É comum, na análise citológica em pacientes com leucemia, a observação de formas celulares não básicas, de contorno irregular, com expansões de diversos tipos e formas³.

Os critérios morfológicos citados por Guseo sobre formas linfocitárias ativadas ou modificadas permitem identificar características semelhantes em células do LCR, mesmo em condições normais. Tais observações são confirmadas neste estudo, como consta da tabela 1.

Em 1975, Catovski e col.³ demonstraram haver receptores para Fc, imunoglobulinas e hemácias de camundongo nestas formas celulares. A presença destes marcadores sugere pertencerem tais células ao contingente B. No entanto, aqueles autores consideram a possibilidade de que elas façam parte do grupo linfócitos K, devido à densidade de receptores Fc e à possibilidade de estarem sendo detectadas imunoglobulinas aderidas passivamente a esses receptores. Secundariamente à presença destas imunoglobulinas poderiam ocorrer os fenômenos observados por Catovski.

A natureza e função dos linfócitos modificados no LCR não é conhecida. No entanto, é de observação corrente o aumento de formas modificadas no LCR em processos inflamatórios e infecciosos subagudos ou crônicos do SNC. Esta observação se efetiva em patologias como a esclerose múltipla, nas quais não são detectados aumentos do contingente de linfócitos B. Tal fato sugere a consideração da hipótese segundo a qual as células modificadas do sistema linfocitário fariam parte do contingente de células linfóides mediadoras de citotoxicidade anticorpo-dependente ou células K.

RESUMO E CONCLUSÕES

Para material constituído de 50 casos devidamente selecionados para representar controle de normalidade e para metodologia que possa garantir real aplicabilidade ao LCR, é possível caracterizar subpopulações linfocitárias com distribuição normal de valores e baixa dispersão de resultados, qual seja o con-

tingente considerado. Os dados (média \pm desvio padrão) obtidos foram (%): para linfócitos B $7,0 \pm 1,44$; para linfócitos T $76,0 \pm 2,92$; para linfócitos T-ativos $53,7 \pm 3,26$; para linfócitos T-ávidos $19,2 \pm 4,32$ na subpopulação T e $11,1 \pm 2,04$ no contingente T-ativo; para o contingente T-sensibilizado ou ativado $22,3 \pm 3,95$.

É possível que o contingente T-sensibilizado seja representado não pelos linfócitos T-ativos, mas pela diferença entre o número de linfócitos T e o número de linfócitos T-ativos para cada caso estudado. Em todas as amostras estudadas, as subpopulações T e T-ativa são contingentes linfocitárias diferentes quanto à densidade de receptores de superfície, evidenciada pelo fenômeno de avidéz por hemácias de carneiro.

É possível também que as células modificadas do sistema linfocitário, identificadas como constituintes do perfil citomorfológico normal, façam parte do contingente de células citotóxicas anticorpo-dependentes ou células "killer".

SUMMARY

Lymphocyte subpopulations in the cerebrospinal fluid. III. Normal values.

For cerebrospinal fluid (CSF) samples from 50 subjects previously selected to represent suitably a normal control group and for a methodology that may be actually used for CSF samples even with normal cell count, it is possible to characterize lymphocyte subpopulations with normal statistical distribution and low dispersion of results for all lines considered. Data (mean \pm standard deviation) here estimated were (%): for B-lymphocyte subpopulation 7.0 ± 1.44 ; for T lymphocyte subpopulation 76.0 ± 2.92 ; for T-active lymphocytes 53.7 ± 3.26 ; for T-avid lymphocytes 19.2 ± 4.32 when all T subpopulation is considered, and 11.1 ± 2.04 when only T-active subpopulation is studied; for T-sensitized or actually activated 22.3 ± 3.95 .

These data may suggest that lymphocytes actually related to immunological activation will be properly represented by the difference between T-lymphocytes and its T-active line in each case. In every samples T and T-active lymphocytes are different subpopulations when surface receptor density is considered, by evidence of avidity for sheep erythrocytes.

It is also possible that killer lymphocytes, or antibody mediated cytotoxic cells, may be related to modified lymphoid cells identified in the CSF normal cytomorphological profile.

REFERENCIAS

1. BACH, J. F. — Evaluation of T-cells and thymic serum factors in man using the rosette technique. *Transplant. Rev.* 16:196, 1973.
2. CASPARY, E. A. & FIELD, E. J. — Lymphocyte sensitization to basic protein of brain in multiple sclerosis and other neurological diseases. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* (London) 37:701, 1974.

3. CATOVSKY, D.; PAPAMICHAIL, M.; OKOS, A.; MILIANI, E. & HOLBOROW, E. J. — Formation of mouse red cell rosettes by «hairy» cells. *Biomedicine* 23:81, 1975.
4. CZLONKOWSKA, A.; PÓLTORAK, M.; CENDROWSKI, W. & KORLAK, J. — Lymphocyte subpopulations in the cerebrospinal fluid and peripheral blood in multiple sclerosis. *Acta neurol. scand.* 62:55, 1980.
5. FELSBURG, P. J.; EDELMAN, R. & GILMAN, R. H. — The active E rosette test: correlation with delayed cutaneous hypersensitivity. *J. Immunol.* 116:1110, 1976.
6. GUSEO, A. — Morphological signs as indications of function of cells in the cerebrospinal fluid. *J. Neurol.* 212:159, 1976.
7. KAM-HANSEN, S. — Distribution and function of lymphocytes from the cerebrospinal fluid and blood in patients with multiple sclerosis. *Acta neurol. scand.* 62 (suppl. 75):1-81, 1980.
8. KAM-HANSEN, S.; FRYDÉN, A. & LINK, H. — B and T lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood in multiple sclerosis, optic neuritis and mumps meningitis. *Acta neurol. scand.* 58:95, 1978.
9. LISAK, R. P.; ZWEIMAN, B.; WATERS, D.; KOPROWSKI, H. & PLEASURE, D. E. — Cell-mediated immunity to measles, myelin basic protein, and central nervous system extract in multiple sclerosis. *Neurology (Minneapolis)* 28:798, 1978.
10. LISAK, R. P.; ZWEIMAN, B. & WHITAKER, J. N. — Spinal fluid basic protein immunoreactive material and spinal fluid lymphocyte reactivity to basic protein. *Neurology (New York)* 31:180, 1981.
11. MACHADO, L. R. — Subpopulações celulares do líquido cefalorraqueano: I. Principais registros da literatura. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 41:119, 1983.
12. MACHADO, L. R. — Subpopulações celulares do líquido cefalorraqueano: II. Técnica. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 41:132, 1983.
13. MACHADO, L. R.; LIVRAMENTO, J. A.; TABARES-OLIVES, A.; CLEMENTE, H. A. M. & SPINA-FRANÇA, A. — Dinâmica da sinalização citomorfológica do líquido cefalorraqueano. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 37:1-6, 1979.
14. MANCONI, P. E.; MARROSU, M. G.; CIANCHETTI, C.; ENNAS, M. G.; MANGONI, A. & ZACCHEO, D. — Lymphocyte subpopulations in cerebrospinal fluid and peripheral blood in multiple sclerosis. *Acta neurol. scand.* 62:165, 1980.
15. MANCONI, P. E.; ZACCHEO, D.; BUGIANI, O.; FADDA, M. F.; CADONI, A.; MARROSU, M. G.; CIANCHETTI, C. & GRIFONI, V. — Surface markers on lymphocytes from human cerebrospinal fluid: predominance of T lymphocytes bearing receptor for the Fc segment of IgG. *Eur. Neurol.* 17:87, 1978.
16. MANCONI, P. E.; ZACCHEO, D.; BUGIANI, O.; FADDA, M. F.; GRIFONI, J.; MANTOVANI, G.; GIACCO, G. S. & TOGNELLA, S. — T and B lymphocytes in normal cerebrospinal fluid. *New Engl. J. Med.* 294:49, 1976.
17. McDEVITT, H. O. — Current concepts in immunology: regulation of immune response by the major histocompatibility system. *New Engl. J. Med.* 303:1514, 1980.
18. MILLER, J. F. A. P. — Restrictions imposed on T lymphocyte reactivities by the major histocompatibility complex: implications for T cell repertoire selection. *Immunol. Rev.* 42:76, 1978.
19. MOSER, R. P.; ROBINSON, J. A. & PROSTKO, E. R. — Lymphocyte subpopulations in human cerebrospinal fluid. *Neurology (Minneapolis)* 26:726, 1976.
20. NAESS, A. & NYLAND, H. — Multiple sclerosis: T lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood. *Eur. Neurol.* 17:61, 1978.
21. OEHMICHEN, M. — Cerebrospinal Fluid Cytology. Saunders, Philadelphia, 1976.
22. SPINA-FRANÇA, A. — Líquido cefalorraqueano. In Tolosa, A. & Canelas, H. M. — *Propedêutica Neurológica*. Ed. Fundo Edit. Prociencx. Ed. 2, São Paulo, 1971, pg. 443-465.
23. SPINA-FRANÇA, A.; MACHADO, A. B. B.; PASQUALIN, J. R. — Técnica de Suta e identificação de células neoplásticas no líquido cefalorraqueano. *Arq. Neuro-Psiquiat. (São Paulo)* 29:463, 1971.