

SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS DO LÍQUIDO CEFALORRAQUEANO

II. TÉCNICA

L. R. MACHADO *

Sendo conceituado o sistema nervoso central (SNC) como um sistema compartimentalizado que guarda relativa autonomia em relação ao restante da economia do corpo, os processos imunológicos mantêm nele certas particularidades. Por um lado, a barreira hêmato-encefálica restringe a entrada de anticorpos e de antígenos sistêmicos. Por outro lado, o SNC e as estruturas contidas no líquido cefalorraqueano (LCR) carecem de estruturas linfóides organizadas e têm poucos linfócitos participando de sua população celular em condições normais.

Em função desses fatores e baseando-se na homologia existente entre os linfócitos do LCR e os do restante da economia, é necessário adotar técnicas especiais para o estudo de subpopulações linfocitárias do LCR. Constitui o objeto deste estudo descrever a técnica padronizada para o estudo dessas subpopulações celulares do LCR, a qual permite reprodutibilidade segura mesmo quando amostras oligocelulares, como as de LCR normal são consideradas.

METODO

Preparo da amostra — Imediatamente após a colheita do LCR, em amostra de 10 ml é feita a contagem global de células em câmara tipo Fuchs-Rosenthal e a análise citomorfológica em preparados obtidos por sedimentação gravitacional acelerada segundo Suta e coradas, posteriormente, segundo Leishman 14.

O restante da amostra é submetido a centrifugação a temperatura ambiente por 10 minutos, a 200 G. O sobrenadante é retirado cuidadosamente mediante eversão do tubo de centrifugação e, na mesma posição e com a mesma inclinação do tubo, é enxugado o volume residual aderido à sua borda, com papel de filtro. Ao sedimento são acrescentados 100 μ l de solução salina balanceada de Hank (SSBH), pH 7,2, enriquecida com soro fetal bovino na concentração de 25%. Em seguida é feita ressuspensão do sedimento e são separadas três amostras de 40 μ l cada uma, em tubos de vidro de 6 x 50 mm. Uma delas é utilizada para a quantificação de linfócitos B, outra para a quantifi-

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

cação de linfócitos T e a terceira para a quantificação de linfócitos T-ativos, as quais são procedidas a seguir.

Linfócitos B — São eles caracterizados pela propriedade de formar rosáceas com partículas de zimosan na presença de complemento de camundongo, segundo a técnica de Mendes e col.¹⁰ adaptada ao LCR. As partículas de zimosan são preparadas e mantidas em solução salina a 4°C. Para uso no LCR foi feita diluição (1 : 30) da solução padrão de zimosan, resultando uma concentração aproximada de 6×10^5 partículas por ml. Para cada determinação, $40 \mu\text{l}$ desta solução de zimosan são incubados com $40 \mu\text{l}$ de complemento de camundongo, não diluído, a 37°C, por 30 minutos. Esta solução é lavada duas vezes em 2 ml de SSBH a temperatura ambiente, cada uma seguida de centrifugação a 200 G por 5 minutos e retirada do sobrenadante por eversão do tubo. Após a última lavagem, o botão de zimosan-complemento é ressuspensão em $80 \mu\text{l}$ de SSBH. A primeira amostra de $40 \mu\text{l}$ da suspensão de células do LCR é acrescentado um volume de $40 \mu\text{l}$ do complexo zimosan-complemento assim obtido. Após homogeneização, é feita centrifugação a 200 G por 5 minutos. Acrescenta-se, a seguir, uma gota de azul de metileno a 1% em SSBH. Procede-se a ressuspensão cuidadosa com pipeta Pasteur. A leitura é feita em câmara de Fuchs-Rosenthal. São considerados linfócitos B aqueles que apresentam 3 ou mais partículas aderidas à sua superfície.

Linfócitos T — São eles caracterizados pela capacidade de formar rosáceas com hemácias de carneiro, de acordo com técnica padronizada por Jondal e col.^{2,3,4}, seguindo as adaptações a uso em amostras de LCR propostas por Naess e col.^{12,13}, Moser e col.¹¹ e Kam-Hansen e col.⁷. As hemácias de carneiro são mantidas em solução estéril de Alsever, a 4°C e, após lavagem com solução fisiológica (3 vezes), são ajustadas a uma concentração aproximada de 9×10^4 elementos por ml em SSBH enriquecida com soro bovino fetal a 25%. A segunda amostra de $40 \mu\text{l}$ da suspensão celular do LCR é ajuntado um volume de $40 \mu\text{l}$ da suspensão de hemácias de carneiro. Procede-se, sucessivamente, à incubação a 37°C por 5 minutos, centrifugação a 200 G em temperatura ambiente por 5 minutos e incubação em mistura água-gelo por 2 h. Acrescenta-se uma gota de azul de metileno a 1% em SSBH e faz-se a ressuspensão cuidadosa do sedimento, com pipeta Pasteur. Procede-se, a seguir, à contagem em câmara de Fuchs-Rosenthal, sendo considerados linfócitos T aqueles que apresentam 3 ou mais hemácias agregadas à sua superfície.

Linfócitos T-ativos — São eles quantificados também pela propriedade de formar rosáceas com hemácias de carneiro, segundo técnica introduzida por Wybran e Fudenberg¹⁵ e seguindo a adaptação a uso em amostras de LCR introduzida por Kam-Hansen e col.⁸. As hemácias de carneiro são preparadas de modo análogo ao descrito para os linfócitos T. A terceira amostra de $40 \mu\text{l}$ da suspensão de células do LCR é misturada a $40 \mu\text{l}$ da suspensão de hemácias de carneiro. Procede-se a incubação a 37°C por 1 h. A seguir é feita centrifugação a 200 G por 5 minutos; ressuspensão

são com pipeta Pasteur após a adição de 1 gota de azul de metileno a 1% em SSBH e leitura em câmara tipo Fuchs-Rosenthal. São considerados linfócitos T-ativos aqueles que formam rosáceas com 3 ou mais hemácias.

COMENTARIOS

A dispersão de resultados em estudos relativos ao perfil linfocitário do líquido cefalorraqueano⁹, ao contrário do que se verifica para linfócitos da corrente circulatória, postula um rigor técnico maior e algumas adaptações relativas as particularidades do sistema LCR.

Para a determinação da subpopulação B foi utilizado, como marcador, o mapeamento de receptores para a fração C₃ do complemento, segundo padronização de Mendes e col. para linfócitos do sangue¹⁰. Não foram introduzidas modificações importantes, à exceção do uso de complemento de camundongo sem diluição, enquanto o método original aconselha diluição a 1:5. Alguns detalhes de técnica são importantes para assegurar a regularidade e a baixa dispersão dos resultados: a homogenização correta das partículas de zimozan, por repetição vigorosa de manobras de ressuspensão, com seringa tipo insulina, até não serem observados grumos à optomicroscopia; deve haver uma proporção aproximada de 80 a 100 partículas de zimozan para cada linfócito; o complemento de camundongo deve ser conservado a — 20°C por período não superior a 3 semanas; embora a leitura em câmara de contagem possa ser feita imediatamente após a centrifugação do complexo zimozan-complemento com a suspensão de linfócitos, a manutenção do material a temperatura ambiente por tempo não superior a 30 minutos antes da leitura não interfere no resultado. É muito importante, durante a leitura, a distinção entre linfócitos e polimorfonucleares, sobretudo eosinófilos, que apresentam grande densidade de receptores para C₃, por vezes dificultando a identificação da célula formadora de rosáceas. Também é crucial a distinção entre o fenômeno de aderência de partículas à membrana celular e o fenômeno de fagocitose do zimozan por macrófagos, que se inicia precocemente e se processa com relativa facilidade.

Os linfócitos T foram quantificados segundo a técnica de Jondal e col.^{2,3,4}. As adaptações metodológicas para uso em LCR foram estabelecidas incorporando modificações propostas por Naess¹², Moser e col.¹¹ e Kam-Hansen e col.^{6,7}. Além dos cuidados já clássicos, descritos para a padronização do método, alguns outros se revelaram importantes no decorrer do estudo. As hemácias devem provir da mistura do sangue de três carneiros e não devem ser usadas antes de uma semana nem depois de duas ou no máximo três semanas após a colheita, sendo sempre mantidas a 4°C em solução de Alsever. Outro fator de extrema importância é o pH do meio, que se altera com facilidade ao ocorrer contaminação seja por bactérias, seja por leveduras. Segundo Bach¹, o pH do meio não interfere nos resultados, a não ser pela inibição do fenômeno de formação de rosáceas, que ocorre em pH acima de 8,2. Talvez pela menor capacidade de tamponamento do sistema LCR, foi verificado ocorrer inibição de formação de rosáceas a partir de pH 7,8, evoluindo progressiva-

mente até seu bloqueio completo a pH acima de 8,5. Por outro lado, o pH abaixo de 7,0 condiciona o aumento do número de rosáceas e o aumento da avidéz de cada linfócito por hemácias de carneiro a tal ponto que, a um pH aproximado de 6,5, a maioria dos linfócitos T apresenta 10 ou mais hemácias aderidas e quase todos os linfócitos passam a formar rosáceas. É possível que as condições de obtenção e utilização das hemácias e a influência do pH sejam, em boa parte, responsáveis pela dispersão de resultados verificada na literatura para linfócitos T do LCR. Deve ser ressaltado também que o tempo de incubação dos linfócitos na presença de hemácias na mistura água-gelo é um fator importante, tendo sido verificada uma tendência à diminuição da população de linfócitos depois de três horas de incubação, discordando dos achados de Naess¹², que preconiza a sua manutenção em mistura água-gelo por uma noite. A leitura em câmara tipo Fuchs-Rosenthal é trabalhosa e exige extremo cuidado na distinção entre linfócitos e reticulomonócitos.

Para a determinação de linfócitos T-ativos foram utilizados os critérios técnicos de Wybran e Fudenberg adaptados por Kam-Hansen para uso em LCR^{5,15}. Foi introduzida uma modificação na metodologia: procedeu-se à incubação a 37°C não apenas da suspensão de linfócitos, mas da suspensão de linfócitos e de hemácias de carneiro conjuntamente. Tal procedimento é análogo ao utilizado para quantificação de linfócitos T. O tempo de incubação mais prolongado, uma hora, não provoca a lise de hemácias desde que estas tenham sido conservadas segundo os critérios citados anteriormente. Com essa modificação, não foram alterados os valores médios, mas a dispersão foi reduzida significativamente.

Os mesmos cuidados técnicos relativos à padronização de linfócitos T são preconizados para linfócitos T-ativos, especialmente os relativos à diferenciação na câmara de contagem entre os linfócitos e os reticulomonócitos.

RESUMO

Na determinação de subpopulações linfocitárias, as particularidades do contingente celular do líquido cefalorraqueano justificam a adoção de metodologia rigorosa e a introdução de variantes de técnica. A técnica empregada e as variantes introduzidas são descritas, visando a obter baixa dispersão e alta reprodutibilidade de resultados.

SUMMARY

Lymphocyte subpopulations in the cerebrospinal fluid. II. Technique.

In order to achieve a low dispersion and a high reproductibility of results in the determination of cerebrospinal fluid lymphocyte subpopulations a more accurated methodology is described, and some variants of technique are registered.

REFERENCIAS

1. EACH, J. F. — Evaluation of T-cells and thymic serum factors in man using the rosette technique. *Transplant. Rev.* 16:196, 1973.
2. JONDAL, M.; HOLM, G. & WIGZELL, H. — Surface markers on human T and B lymphocytes: I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. exp. Med.* 136:207, 1972.
3. JONDAL, M. & KLEIN, G. — Surface markers of human B and T lymphocytes: II. Presence of Epstein-Barr virus receptors on B lymphocytes. *J. exp. Med.* 138:1365, 1973.
4. JONDAL, M.; WIGZELL, H. & AIUTI, F. — Human lymphocyte subpopulations: classification according to surface markers and/or functional characteristics. *Transplant. Rev.* 16:163, 1973.
5. KAM-HANSEN, S. — Reduced number of active T cells in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Neurology (Minneapolis)* 29:897, 1979.
6. 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.
7. KAM-HANSEN, S.; FRYDÉN, A. & LINK, H. — B and lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood in multiple sclerosis, optic neuritis and mumps meningitis. *Acta neurol. scand.* 58:95, 1978.
8. KAM-HANSEN, S.; ROSTROM, B. & LINK, H. — Active T cells and humoral immune variables in blood and cerebrospinal fluid in patients after acute unilateral idiopathic neuritis. *Acta neurol. scand.* 61:298, 1980.
9. MACHADO, L. R. — Subpopulações linfocitárias do líquido cefalorraqueano normal: I. Principais registros da literatura. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 41:119, 1983.
10. MENDES, N. F.; MIKI, S. S. & PEIXINHO, Z. F. — Combined detection of human T and B lymphocytes by rosette formation with sheep erythrocytes and Zymosan-C₃ complexes. *J. Immunol.* 113:531, 1974.
11. MOSER, R. P.; ROBINSON, J. A. & PROSTKO, E. R. — Lymphocyte subpopulations in human cerebrospinal fluid. *Neurology (Minneapolis)* 26:726, 1976.
12. NAESS, A. — Demonstration of T lymphocytes in cerebrospinal fluid. *Scand. J. Immunol.* 5:165, 1976.
13. NAES, A. & NYLAND, H. — Multiple sclerosis: T lymphocytes in cerebrospinal fluid and blood. *Eur. Neurol.* 17:61, 1978.
14. SPINA-FRANÇA, A.; MACHADO, A. B. B.; PASQUALIN, J. R. — Técnica de Suta e identificação de células neoplásicas no líquido cefalorraqueano. *Arq. Neuro-Psiquiat.* (São Paulo) 29:463, 1971.
15. WYBRAN, J. & FUDENBERG, H. H. — Thymus-derived rosette-forming cells in various disease states: cancer, lymphoma, bacterial and viral infections, and other diseases. *J. clin. Invest.* 52:1026, 1973.

Centro de Investigações em Neurologia — Caixa Postal 5199 — 01000 São Paulo, SP — Brasil.