

ANÁLISE ULTRA-ESTRUTURAL DO LÍQUIDO CEFALORRAQUIANO DE PARKINSONIANOS

JAMES PITAGORAS DE MATTOS* — ALEXANDRE ALENCAR**
ANGELA GONÇALVES DA SILVA***

RESUMO — Pelo método da coloração negativa, o estudo ultra-estrutural do líquido cefalorraquiano, em 20 casos de parkinsonismo, mostrou presença de estruturas não-identificadas, com configurações geométricas, em 30%. Consideradas como suspeitas de conterem partículas virais, por questão de método, não levaram a dados estatisticamente significativos se comparados à incidência de mortalidade entre os animais de experimentação. Artefatos ou não, estas estruturas merecem registro.

Ultrastructural cerebrospinal fluid analysis of parkinsonians.

SUMMARY — Ultrastructural cerebrospinal fluid of 20 parkinsonian patients examined by negative staining showed not recognizable structures thought to be of viral origin in 6 cases (30%). However, mortality rate analysis failed to disclose significant differences between the inoculated animals. Either artefact or not, such structures deserve to be reported.

Um dos mais notáveis e óbvios fatores ambientais associados ao parkinsonismo, até agora, foi encefalite viral, particularmente a letárgica. Apesar de a distinção da síndrome pós-encefalítica desenvolvida nos sobreviventes não ser propriamente a doença de Parkinson, sugeriu-se a idéia de que esta poderia ser de origem viral. Nos últimos anos, sabemos que vários controles sorológicos de parkinsonianos foram realizados para comprovar títulos de anticorpos elevados de uma variedade de viroses comuns. No entanto, nos testes sorológicos efetuados — influenza, herpes simples, citomegalovírus, varicela-zóster, sarampo, rubéola, coxsackie, para-influenza, parotidite, entre outros — nenhuma prova sustentou a associação com a doença de Parkinson ou, mesmo, com o parkinsonismo pós-encefalítico. Os estudos sorológicos podem, contudo, falhar em mostrar a evidência de um vírus defectivo, incompleto ou latente. A luz da experiência com o Kuru e com a doença de Creutzfeldt-Jacob, parece-nos plausível suspeitar de um agente viral não convencional como fator etiológico. Tentativas para transmitir, similarmente, tanto a doença de Parkinson como o parkinsonismo pós-encefalítico aos primatas, como fizeram Gibbs e Gajdusek², no entanto, fracassaram. A atraente hipótese de origem viral permanece, ainda, em face de algumas experiências que a sustentam. Os resultados negativos, todavia, não necessariamente afastam a etiologia infecciosa. Talvez viroses inadequadas tenham sido

Trabalho realizado no Instituto de Neurologia Deolindo Couto (INDC) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e no Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia da UFRJ: * Professor Adjunto e Doutor; ** Professor Adjunto e Chefe do Laboratório de Neuropatologia do INDC; *** Técnica de nível superior da FINEP.

estudadas ou, então, a sensibilidade das técnicas empregadas tenha sido insuficiente. Apesar de a lista de viroses estudadas ser muito extensa, muitas outras permanecem para considerações posteriores. Lamentavelmente, há poucos indícios avaliados no presente para guiar a seleção de agentes a serem examinados e é possível que esteja envolvido um vírus ainda não reconhecido. Presume-se, de acordo com Duvoisin¹, que um agente não convencional, incompleto ou defectivo persista em estado latente, não replicante, e cause prematura morte ou "envelhecimento" dos neurônios pigmentados do tronco cerebral. Para Duvoisin¹, a origem de um agente que preencha com nitidez todos estes critérios apresenta enormes obstáculos.

O escopo deste trabalho é contribuir para o esclarecimento etiológico da doença de Parkinson, estudando, pelo método da coloração negativa, o aspecto ultra-estrutural do líquido cefalorraquiano (LCR) de 20 pacientes.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizamos, como material, o LCR de 20 pacientes parkinsonianos que serviu para o estudo ultra-estrutural pelo método da coloração negativa. Dos 20 casos, 11 eram femininos e 9 masculinos: 17 eram brancos, dois pretos e um pardo; tinham a média de idade de 60 anos e todos pertenciam ao tipo etiológico idiopático.

Após a retirada de 15 ml de LCR de cada paciente, estes foram acondicionados em «freezer» a -20°C . Para o estudo ultra-estrutural, concentramos este material em 15 vezes do seu volume inicial em tubo de diálise de celulose, permeação de 12000 a 14000 (MW «cut off»), com a ajuda de polietileno glicol 6000 (Carbowax). Assim, ficamos com o volume final concentrado de 1 ml. A seguir, utilizamos a coloração pelo ácido fosfotúngstico a 2% (PTA) e pelo silicotungstato de sódio a 2% (STS).

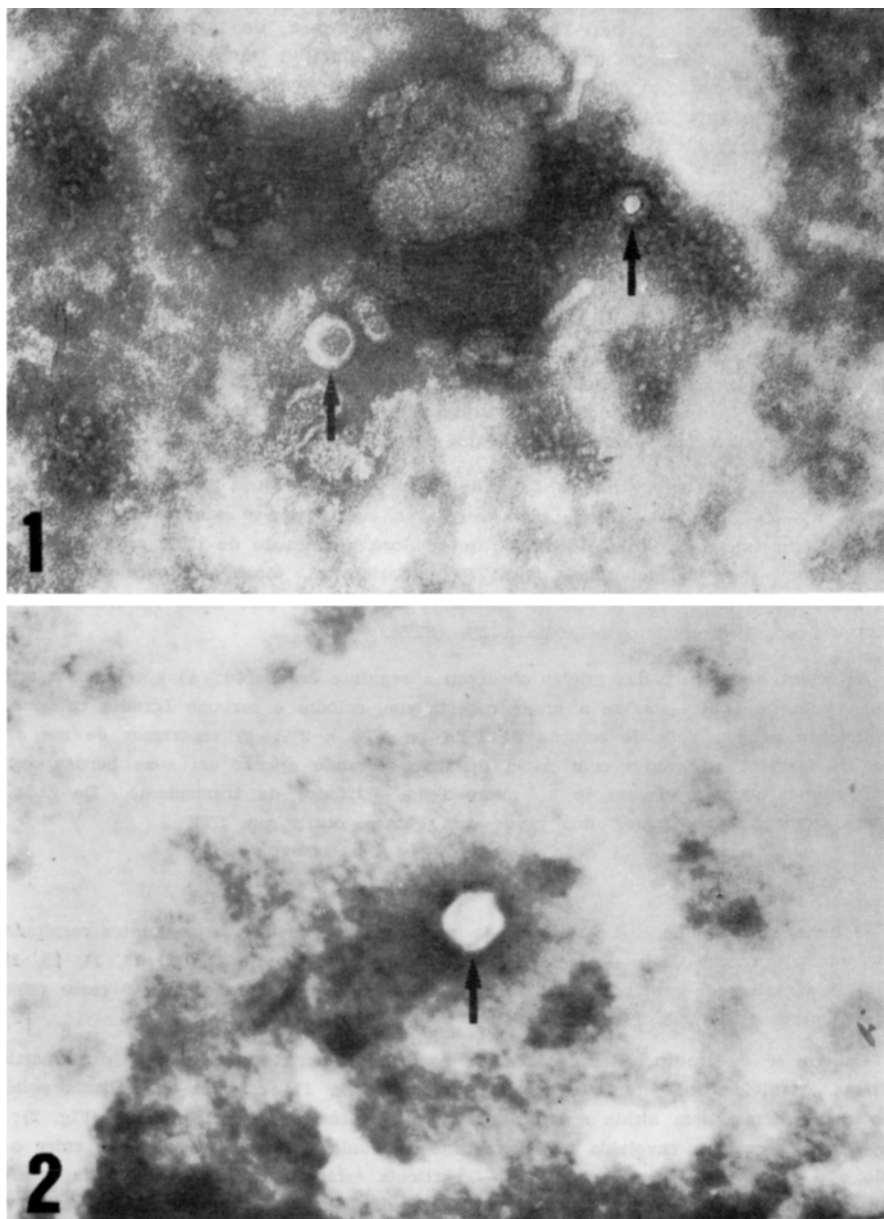
A técnica de preparo das grades obedeceu a seguinte ordenação: a) gotejamos a amostra — uma gota de LCR — sobre a grade coberta com colódio e carbono (grades carbonadas); b) adicionamos uma gota de solução de PTA ou STS a 2%; c) esperamos de um a dois min; d) lavamos as grades com papel de filtro tocando apenas em suas bordas, estando assim prontas para a observação ao microscópio eletrônico de transmissão. De cada caso de parkinsonismo, preparamos uma grade com PTA e outra com STS.

RESULTADOS

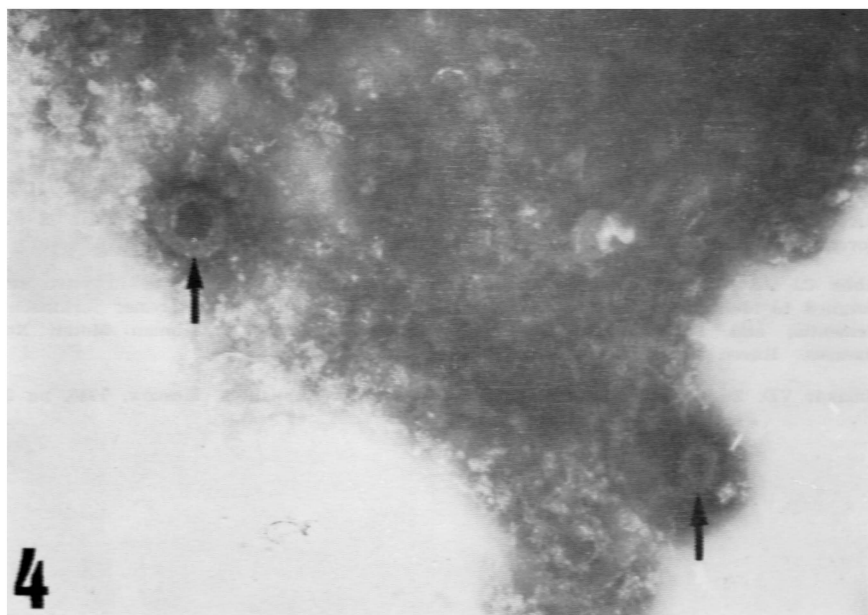
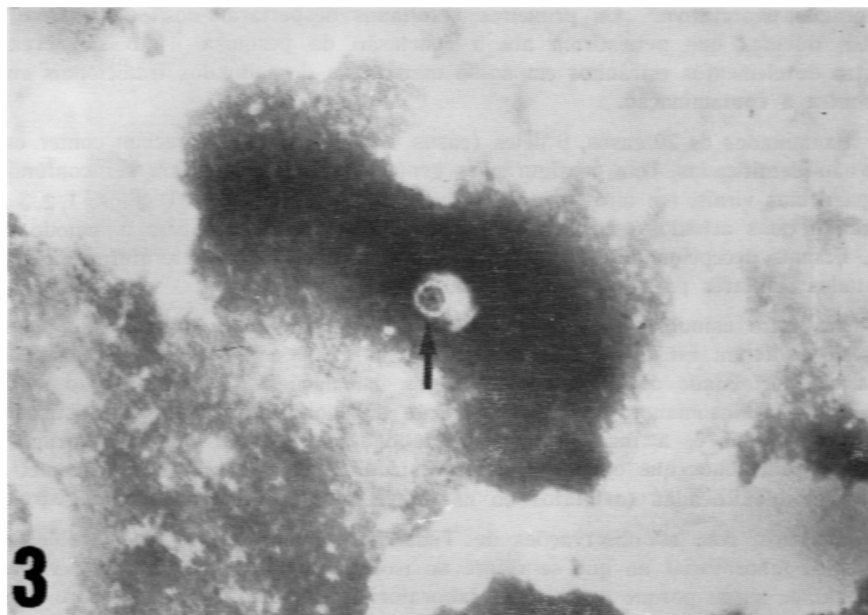
O material proveniente de 20 casos de parkinsonismo revelou os seguintes resultados — a) normal: 14 casos (70%) — os de números 1, 2, 3, 5, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 19 e 20; b) suspeitos de conterem estruturas semelhantes às partículas virais: 6 casos (30%) — os de números 4, 6, 7, 8, 16 e 18.

Os que se mostraram alterados têm as seguintes descrições: caso 4 — duas partículas esféricas, envolvidas por dupla membrana espessa (Fig. 1); caso 6 — partícula polidédrica de conteúdo denso, com nítida separação entre o envoltório e a parte central (Fig. 2); caso 7 — partícula esférica envolvida por membrana de duplo contorno, com espaço entre o conteúdo e a membrana (Fig. 3); caso 8 — partícula esférica envolvida por dupla membrana e de conteúdo denso; caso 16 — estrutura tubular, enovelada, lembrando paramixovírus; caso 18 — duas partículas esféricas densas, envolvidas por membrana espessa (Fig. 4).

Pelo fato de, surpreendentemente, termos encontrado 30% de casos suspeitos de conterem estruturas semelhantes às partículas virais, em outro estudo comparamos a incidência de mortalidade após inoculações intracerebrais de material do LCR em camundongos, separando estes casos (30% — suspeitos) dos não-suspeitos (70%). Os resultados mostraram mortalidade proporcionalmente semelhante entre os dois grupos.



Figs. 1 e 2 — Eletronomicrografias, pela técnica da colocação negativa, de LCR de parkinsonianos. Em 1, duas particulas esféricas, uma maior que a outra, envolvidas por dupla membrana espessa; por baixo da membrana, estrutura compacta arredondada (142000X). Em 2, partícula poliédrica, de conteúdo denso (160000X).



Figs. 3 e 4 — Eletromicrografias, pela técnica da coloração negativa, de LCR de parkinsonianos. Em 3, partícula esférica envolvida por dupla membrana e de conteúdo denso (114000×). Em 4, duas partículas esféricas, densas, envolvidas por membranas espessas (151000×).

COMENTARIOS

O estudo ultra-estrutural do LCR pelo método da coloração negativa, foi iniciado com grande expectativa. Os primeiros resultados despertaram-nos surpresas e, em seguida, dúvidas que persistiram até a conclusão da pesquisa. Isto se deveu ao encontro de elementos estranhos em nosso material, a despeito dos tradicionais cuidados contra a contaminação.

Examinados os 20 casos, 6 deles (casos 4, 6, 7, 8, 16 e 18) pareciam conter estruturas não-identificadas, com configurações geométricas, que poderiam ser confundidas com partículas virais, em alto grau de significado estatístico (30%) (Figs. 1, 2, 3 e 4). Encarando estes achados com extrema cautela, como bem recomenda o método científico, ficamos decepcionados com a quase total inexistência, na literatura consultada, de estudos similares para que pudéssemos cotejá-los.

Em outro estudo, separamos os casos considerados como suspeitos e não-suspeitos de conterem estruturas estranhas no LCR. Em seguida, comparamos a incidência de mortalidade dos camundongos após inoculações intracerebrais do material do LCR de parkinsonianos. A experimentação não conduziu a dados estatisticamente significativos, isto é, a incidência de mortalidade foi similar nos dois grupos de animais. Concluimos que o achado destas estruturas com configurações geométricas, embora não-identificadas (artefatos ou não de técnica), devem merecer registro.

Sabemos, com as observações de Timakov e Zuev³, do grande problema do diagnóstico laboratorial no que se refere ao isolamento do agente causal persistente. A dificuldade surge porque os métodos laboratoriais, comumente usados para detectar infecções virais agudas, podem não ser aplicáveis à identificação das mesmas viroses quando estas causam processo infeccioso do tipo lento, particularmente nas doenças neurológicas. Assim, em que pese a negatividade do estudo ultra-estrutural no LCR de parkinsonianos, acreditamos, de acordo com a literatura, que a teoria da infecção viral não pode ser, ainda, afastada em definitivo.

REFERÊNCIAS

1. Duvoisin RC — The cause of Parkinson's disease. In Marsden CD, Fahn S (eds): *Movement Disorders*, Butterworth, London, 1981, pg 8.
2. Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC — An update on long-term in vivo and in vitro studies designed to identify a virus as the cause of amyotrophic lateral sclerosis, parkinsonism-dementia, and Parkinson's disease. In Rowland LP (ed): *Human Motor Neuron Diseases*. Raven Press, New York, 1982, pg 343.
3. Timakov VD, Zuev VA — *Slow Virus Infections*. Mir Publishers, Moscow, 1980, pg 243.