Paulo Diniz da Gama

**Estudo de bandas oligoclonais restritas ao líquido
cefalorraquidiano em pacientes com esclerose múltipla
na cidade de São Paulo**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Área de concentração: Neurologia

Orientador: Prof. Dr. Dagoberto Callegaro

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Gama, Paulo Diniz da

Estudo de bandas oligoclonais restritas ao líquido cefalorraquidiano em
pacientes com esclerose múltipla na cidade de São Paulo / Paulo Diniz da Gama.
-- São Paulo, 2009.

Tese (doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Neurologia.

Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Dagoberto Callegaro.

Descritores: 1.Esclerose múltipla 2.Líquido cefalorraquidiano 3.Bandas
oligoclonais 4.Brasil

USP/FM/SBD-149/09

Dedico

À Gisah, sinônimo de determinação, incentivo, carinho, cumplicidade e principalmente compreensão por minha ausência, concedendo uma oportunidade de me realizar.

Aos meus filhos Rodrigo e Daniel, cuja ética, amor e generosidade são uma constante. Que este trabalho, fruto de grande esforço pessoal, sirva de referência para que vocês possam sempre lembrar que as conquistas residem na não desistência de seus sonhos, e de que vale a pena criar marcos durante nossa breve passagem pela vida.

Aos meus pais, Dr. Diniz e Dona Neuza, que dedicaram suas vidas à formação de seus filhos, e pelo apoio e exemplos de luta, doação, amor e respeito.

AGRADECIMENTOS

Agradeco

Ao **Prof. Dr. Dagoberto Callegaro**, responsável pelo serviço de Doenças Desmielinizantes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo, orientador desta obra, pela confiança, pela amizade, pelo exemplo pessoal e profissional, somado aos ensinamentos e incentivos durante estes anos. Meu eterno agradecimento.

Ao **Prof. Dr. Luis dos Ramos Machado**, professor do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, co-orientador desta obra, pela disponibilidade e ajuda no acompanhamento em todas as fases da pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto**, professor de Neurologia e Oftalmologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela revisão deste trabalho, incentivo e intervenção desde os primeiros momentos da decisão do início desta obra.

Ao **Prof. Dr. José Antônio Livramento**, professor do Departamento de Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e Chefe pelo Centro de Investigações em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e ao **Dr. Hélio Rodrigues Gomes**, responsável pelo Centro de Investigações Neurológicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela importante missão de realizar a análise laboratorial das amostras de líquido cefalorraquidiano, pelo apoio e pelas orientações.

Ao **Prof. Dr. Sandro Blasi Espósito**, professor de neurologia da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, campus Sorocaba, pelo incentivo, pelas oportunidades concedidas, e pela confiança em mim depositada durante todos estes anos, tributos que em muitas vezes só são oferecidos a um irmão.

Ao **Prof. Dr. Dario Doretto**, ex-professor de neurologia da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, campus Sorocaba, pelos exemplares ensinamentos práticos da semiologia neurológica e pelo compartilhamento incondicional de seus conhecimentos, fundamentais para a minha formação.

À **Dra. Cicília Yuko Wada**, PhD em Bioestatística da Statpharm Consultoria Científica, pela orientação e ajuda na conclusão da análise estatística deste estudo.

Aos **Drs. Tarso Adoni, Douglas Kazutoshi Sato, Thiago de Faria Junqueira e Samira Luisa dos Apóstolos Pereira**, médicos colaboradores do serviço de Doenças Desmielinizantes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, cuja participação foi de suma importância para o recrutamento da casuística.

À **Sra. Maria Adelaide Rodrigues Bento**, voluntária do ambulatório de doenças desmielinizantes, pela dedicação, eficiência e amor a sua função.

Às **Sras. Darcy Terezinha Borges e Camila Caroline de Sena**, técnicas do Centro de Investigações em Neurologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela eficiente missão de elaboração técnica das amostras, e pela atenção dispensadas durante toda a pesquisa.

Em especial **aos pacientes** que participaram do estudo, pela doação, confiança no meu trabalho, e pela inesgotável esperança que alimenta nossos anseios de mudança.

“Acredito que algo poderá vir disto!”

H.I. Quincke (primeira punção lombar, 1891)

SUMÁRIO

Lista de Abreviatura

Lista de Siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1 Histórico	24
2.2 Anatomia e fisiologia	27
2.3 A coleta do LCR	30
2.4 A análise do LCR	31
2.4.1 Exame físico	33
2.4.2 Exame citológico	33
2.4.3 Exame químico de rotina	33
2.4.4 Análise quantitativa das proteínas	34
2.4.4.1 A albumina	34
2.4.4.2 As imunoglobulinas	35
2.4.5 Análise qualitativa das proteínas – pesquisa de BOC	37
2.5 Alterações do LCR na EM	41
2.6 A demografia e a interpretação dos resultados	43
2.6.1 Variações na apresentação clínica ou fase evolutiva da EM ...	45
2.6.2 Constituição genética de cada população	46
2.6.3 Diferenças na metodologia de pesquisa	47
2.6.4 Diferentes técnicas de análise do LCR empregadas	47
3 OBJETIVOS	49
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	51
4.1 Critérios de inclusão e exclusão	52
4.1.1 Critérios de inclusão para pacientes portadores de EM e CIS ..	53

4.1.2	Critérios de inclusão para portadores de DNI	53
4.1.3	Critérios de inclusão de pacientes controles	54
4.1.4	Critérios de exclusão	54
4.2	Protocolo da avaliação clínica de portadores de EM	55
4.2.1	Dados demográficos	55
4.2.2	Quadro clínico	56
4.3	Protocolo da avaliação clínica para portadores de DNI	58
4.3.1	Dados demográficos	58
4.3.2	História clínica	58
4.3.3	Exame físico neurológico	59
4.4	Protocolo dos pacientes do grupo controle	59
4.5	Protocolo de exames complementares	59
4.5.1	Os exames bioquímicos e sorológicos solicitados	60
4.5.2	Exame de neuro-imagem	61
4.5.3	Protocolo de análise das variantes clássicas do LCR	62
4.5.4	Protocolo para a análise quantitativa das proteínas do LCR	63
4.5.5	Protocolo para a análise qualitativa das proteínas do LCR	64
4.6	Fluxograma do atendimento médico	65
4.7	Análise estatística	66
4.7.1	Teste da validade	66
4.7.2	Estatística descritiva	67
4.7.3	Inferências estatística	68
4.7.4	Software utilizados	68
4.8	Aspectos éticos	69
5	RESULTADOS	70
5.1	Dados demográficos	71
5.1.1	Idade	71
5.1.2	Gênero	72
5.1.3	Etnia	73
5.2	Quadro clínico	74
5.3	Análise qualitativa das proteínas do LCR	75
5.3.1	Estudo de BOC pela FIE em pacientes com EM	75

5.3.2	Estudo de BOC pela FIE em pacientes com CIS	75
5.3.3	Estudo de BOC pela FIE em pacientes com DNI	75
5.3.4	Estudo de BOC pela FIE em pacientes controle	76
5.3.5	Estudo de BOC pela FIE terapia imunomoduladora	76
5.3.6	Estudo de BOC pela eletroforese em gel de agarose	77
5.4	Análise quantitativa das proteínas do LCR	77
5.4.1	O quociente de albumina	77
5.4.2	O índice de IgG	78
5.4.3	O normograma	79
5.5	O estudo quimiocitológico de rotina do LCR	82
5.6	Resultados do LCR com as características demográficas	82
5.6.1	Gênero	82
5.6.2	Etnia	83
5.6.3	A associação entre gênero e etnia com as BOC	84
5.6.4	A associação entre gênero e etnia com o índice de IgG	85
5.7	O quadro clínico e a análise do LCR	86
5.7.1	As diferentes formas clínicas da EM e a análise do LCR	86
5.7.2	A sintomatologia e evolução clínica e as BOC	88
5.8	Análises estatísticas	90
5.8.1	Testes de validade da FIE para o diagnóstico da EM	90
5.8.2	Testes de validade da EGA para o diagnóstico da EM	91
5.8.3	Testes de validade do I IgG para o diagnóstico da EM	91
6	DISCUSSÃO	92
6.1	Caracterização da casuística	93
6.2	A análise do LCR	95
6.3	As características demográficas	98
6.4	O quadro clínico	100
6.5	Considerações finais	102
7	CONCLUSÕES	106
	ANEXOS	108
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133
	APÊNDICE	

LISTA DE ABREVIATURAS

a.C.	Antes de Cristo
ADEM	Encefalomielite Disseminada Aguda
BOC	Bandas Oligoclonais
CIS	Síndrome Clínica Isolada
DNI	Doença Neurológica Inflamatória
EDSS	Escala Expandida do Status de Incapacidade
EEUU	Estados Unidos da América
EGA	Eletroforese em Gel de Agarose
EM	Esclerose Múltipla
FIE	Focalização Isoelétrica
FLAIR	<i>Fluid Attenuate Inversion Recovery</i>
FN	Falso Negativo
FP	Falso Positivo
Gd	Gadolínio
g.l.	Grau de liberdade
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HLA	Antígeno Leucocitário Humano
HTLV	Vírus T-linfotrópico Humano
IB	Immunoblotting
IC	intervalo de confiança
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IP	Impregnação pela Prata
IRM	Imagem de Ressonância Magnética
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MHC	Complexo de Histocompatibilidade Maior
NR	Não Referido

ODD	Outras Doenças Desmielinizantes
PP	Primariamente Progressiva
PR	Progressiva Recorrente
Q Alb	Quociente de Albumina
Q IgG	Quociente de Imunoglobulina G
R	Risco Relativo
RR	Remitente Recorrente
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Secundariamente Progressiva
VN	Verdadeiro Negativo
VP	Verdadeiro Positivo
VR	Valor de referência

LISTA DE SÍMBOLOS

g	grama
kg	quilograma
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
MUI	milhões de unidades internacionais
ng	nanograma
ph	potencial hidrogeniônico
vs	versos
χ^2	qui-quadrado
/	por
$\pm$	mais ou menos
$\leq$	menor ou igual
$\geq$	maior ou igual

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Compartimentos do sistema nervoso central	28
Figura 2	Compartimentos do líquido cefalorraquidiano	30
Figura 3	Organograma da análise do líquido cefalorraquidiano	32
Figura 4	Normograma de acordo com Reiber e Felgenhauer	36
Figura 5	Interpretação dos resultados das bandas oligoclonais de imunoglobulinas	39
Figura 6	Distribuição da etnia nos diversos grupos de pacientes	73
Figura 7	Distribuição em porcentagem das formas clínicas da esclerose múltipla	74
Figura 8	Gráfico de intervalos do índice de IgG vs BOC.....	79
Figura 9	Distribuição da análise das imunoglobulinas nas diversas patologias.....	80
Figura 10	Quociente de imunoglobulina plotado contra o quociente de albumina nos três grupos de pacientes	81
Figura 11	Associação do gênero e etnia dos pacientes portadores de esclerose múltipla, analisados quanto à presença de bandas oligoclonais	85
Figura 12	Associação do gênero e etnia dos pacientes portadores de EM analisados quanto ao índice de IgG	86
Figura 13	Distribuição da presença de bandas oligoclonais pela focalização isoeletrica nas diferentes formas clínicas	87
Figura 14	Distribuição da presença de bandas oligoclonais pela focalização isoeletrica segundo as formas clínicas progressivas e a forma remitente recorrente	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estudo da presença de bandas oligoclonais em pacientes com esclerose múltipla	44
Tabela 2	Imagens de ressonância magnética no diagnóstico da esclerose múltipla	62
Tabela 3	Características clínicas do grupo de pacientes com doenças neurológicas inflamatórias e correlação com a presença de bandas oligoclonais	76
Tabela 4	Características clínicas dos pacientes com esclerose múltipla e correlação com a presença de bandas oligoclonais	89
Tabela 5	Valores, em porcentagem, dos indicadores de significância na detecção de bandas oligoclonais para o diagnóstico da esclerose múltipla	90

RESUMO

GAMA, P.D. **ESTUDO DE BANDAS OLIGOCLONAIS RESTRITAS AO LÍQUIDO CEFALORRAQUIDIANO EM PACIENTES COM ESCLEROSE MÚLTIPLA NA CIDADE DE SÃO PAULO.** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009.

Introdução: O diagnóstico da esclerose múltipla (EM) embora seja clínico, se completa com os resultados de imagem de ressonância magnética, somados ainda com a análise do líquido cefalorraquidiano (LCR), que se constituem em ferramentas indispensáveis. A presença das bandas oligoclonais (BOC) no LCR faz parte do estudo da EM, assim como auxílio no diagnóstico. Existem grandes variações quanto à frequência de BOC em pacientes com EM nas diferentes populações, desde 90% em países nórdicos europeus, até 30 a 60% no Japão, China, Índia e Líbano. O presente estudo tem o objetivo de estabelecer o valor da análise do LCR para o diagnóstico da EM em nossa população, com ênfase na pesquisa de BOC. O estudo também objetiva correlacionar os resultados destas análises com as características clínicas e demográficas da amostra selecionada.

Casuística e Métodos: Foram estudados 145 pacientes selecionados do Centro de Referência de Doenças Desmielinizantes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Universidade de São Paulo, no período de agosto de 2005 a janeiro de 2008. Foram registrados para o estudo os dados demográficos, clínicos e da evolução da doença. O diagnóstico da EM foi estabelecido segundo o painel internacional de McDonald, revisado em 2005. A técnica utilizada para a pesquisa de BOC foi a focalização isoeletrica, seguida do imunoblotting, simultaneamente no LCR e no soro sanguíneo. Os resultados desta análise não foram utilizados para estabelecer o diagnóstico, ou para incluir pacientes na casuística da pesquisa. O grupo controle foi selecionado entre aqueles que se submeteram à anestesia raquidiana para cirurgias de pequeno porte.

Resultados: Apresentaram BOC: 54,4% dos 90 pacientes com EM; 31,2% dos 16 pacientes com síndrome clínica isolada; 17,9% dos 39 pacientes com doenças neurológicas inflamatórias. No grupo controle, os 19 pacientes não apresentaram BOC. A sensibilidade das BOC foi calculada em 54,4%. A especificidade foi de 100% quando comparado ao grupo controle. Quando comparado com o grupo de pacientes com doenças neurológicas inflamatórias, a especificidade foi de 82,1%. Nos pacientes que se autodeclararam de cor parda ou preta, a frequência de BOC foi maior, com significância na borda do nível de significância de 5% ($p=0,0518$). Quanto aos aspectos clínicos evolutivos foi constatada maior presença de BOC nas formas progressivas recorrentes (100%); seguida da forma primariamente

progressiva (87,5%); secundariamente progressiva (54,5%) e forma remittente recorrente (44,3%). A homogeneidade das BOC segundo as formas clínicas foi significativa ($p=0,0103$), ao nível de significância de 5%.

Conclusões: Este trabalho demonstra que a frequência de BOC em pacientes com EM foi de 54,4%, sendo menor que em outras séries mundiais. Estes resultados também não confirmam aqueles obtidos em estudos brasileiros prévios. A etnia e as formas de evolução clínica da doença influenciaram com significância na frequência de aparecimento das BOC. A baixa frequência das BOC no LCR de pacientes com EM pode ser decorrente de fatores associados à baixa e média prevalência da doença nesta região.

Descritores: 1. Esclerose múltipla 2. Líquido cefalorraquidiano 3. Bandas oligoclonais 4. Brasil

ABSTRACT

GAMA, P.D. **STUDY OF OLIGOCLONAL BANDS RESTRICTED TO THE CEREBROSPINAL FLUID IN MULTIPLE SCLEROSIS PATIENTS IN THE CITY OF SÃO PAULO.** [thesis]. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009".

Introduction: The diagnosis of multiple sclerosis (MS) although clinical, is rounded out with the results of magnetic resonance imaging, in addition to an analysis of the cerebrospinal fluid (CSF), which form a set of indispensable tools. The presence of oligoclonal bands (OCB) in the CSF is used in the study and for the diagnosis of MS. The frequency of OCB in MS patients varies widely in different populations, ranging from 90% in Nordic countries, to 30 to 60% in Japan, China, India and Lebanon. The objective of the present study is to establish a reference value for the analysis of CSF for the diagnosis of MS in our population, with an emphasis on the study of OCB. A further objective of the study is to correlate the results of these analyses with the clinical and demographic characteristics of the sample selected.

Methods: The sample was composed of 145 patients selected from the Demyelinating Diseases Reference Center of the Clinical Hospital of the University of São Paulo, from August 2005 to January 2008. Records containing demographic, clinical and disease progression were used for the study. The diagnosis of MS was established according to 2005 Revisions of the McDonald Criteria. To detect OCB, isoelectric focusing was employed, followed by immunoblotting, simultaneously in both the CSF and blood serum. The results of this analysis were not used to establish the diagnosis or to include patients in the study sample. The control group was selected from those who were submitted to spinal tap for anesthesia in minor surgery.

Results: OCB were found in 54.4% of the 90 patients with MS, 31.2% of the 16 patients with isolated clinical syndrome, and 17.9% of the 39 patients with inflammatory neurological diseases. In the control group, 19 patients did not present OCB. The sensitivity of OCB was calculated to be 54.4%. The specificity was 100% when compared to the control group. When compared with the group of patients with inflammatory neurological diseases, the specificity was 82.1%. For the patients who classified themselves as colored or black, the frequency of OCB was higher, with borderline significance using a significance level of 5% ($p=0.0518$). With regard to clinical evolution of MS, the highest presence of OCB was found in the relapsing progressive types (100%); followed by the primary progressive type (87.5%); secondary progressive type (54.5%); and relapsing remitting type (44.3%). The homogeneity of the OCB in relation to the clinical types was significant

($p=0.0103$), at a significance level of 5%. **Conclusions:** This study shows that the frequency of OCB in patients with MS was 54.4%, lower than the findings of other worldwide series. Moreover, these results do not confirm those obtained in other Brazilian studies. Race and clinical progression of the disease influenced, in a statistically significant manner, the frequency of the presence of OCB. The low frequency of OCB in the CSF of patients with MS may be the result of factors associated with the low and medium prevalence of this disease in this region.

Descriptors: 1. Multiple sclerosis 2. Cerebrospinal fluid 3. Oligoclonal bands 4. Brazil

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A esclerose múltipla (EM) é uma doença do sistema nervoso central (SNC) considerada como uma doença desmielinizante de origem inflamatória crônica^{1,2}. Caracteriza-se por uma resposta auto-imuno a componentes da mielina^{1,2,3}, que se manifesta em indivíduos geneticamente susceptíveis^{4,5,6}, desencadeada por um ou mais agentes ambientais^{7,8}. Um processo degenerativo de células nervosas está presente na fisiopatologia da doença. Linhas de pesquisa especulam se este processo degenerativo antecede, ou se é consequente do processo inflamatório^{9,10}.

As limitações da abordagem diagnóstica atual é que não há um parâmetro clínico ou paraclínico, que possa garantir ou excluir o diagnóstico da EM, de maneira inequívoca^{11,12,13}.

Enquanto as técnicas de imagem são de particular importância para demonstrar lesões características, e comprovar a disseminação destas lesões no tempo e espaço^{12,14,15}, o LCR se constitui como importante ferramenta que demonstra uma inflamação crônica no SNC, com características próprias da doença^{2,8,16}. O estudo do LCR também permite afastar o diagnóstico de outras doenças, passíveis de inclusão entre os diagnósticos diferenciais da EM^{3,11,17,18}.

Medidas da concentração das imunoglobulinas são um importante item da análise do LCR, comprovando a presença de uma atividade inflamatória^{2,8,19}. Um dos métodos mais utilizados para a caracterização da produção intratecal de imunoglobulinas é a pesquisa de bandas oligoclonais (BOC), simultaneamente no LCR e no soro¹³.

As BOC não são alterações específicas da EM. Demonstra-se a presença de BOC em várias outras doenças inflamatórias ou infecciosas do SNC, embora os registros quanto à sua frequência sejam variáveis^{3,11,18}. Além disso, alguns autores descrevem a presença de BOC mesmo em doenças não inflamatórias^{18,19,20}.

Existem grandes variações, nas diferentes populações, quanto à frequência de BOC em pacientes com EM^{6,21,57}. São evidentes, contudo, as variações na apresentação clínica nos diversos estudos, as bases genéticas de cada população, e as diferentes técnicas de análise empregadas, o que podem levar a diferentes resultados^{3,11}.

O conhecimento da frequência de BOC da população a que visamos assistir, conjuntamente com a utilização da melhor técnica de análise empregada, são fundamentos essenciais para a otimização da fase investigativa, levando a uma consequente melhor estratégia terapêutica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico

Na antiguidade, as noções que se tinham do LCR eram muito imprecisas. No século XVII a.C., foi descrito no papiro de Edwin, a presença de um fluído dentro das cavidades cerebrais. Em 460 a.C. atribui-se a Hipócrates a punção ventricular em pacientes com hidrocefalia. Herophilus (335 a.C.) conhecia a existência dos ventrículos cerebrais como estrutura anatômica, porém desconhecia suas funções. Galenus (131 a.C.) fez referência a um líquido que procedia dos ventrículos cerebrais e era eliminado pela fossa nasal²².

Na idade moderna, Vesalius (1514), em seus estudos sobre a localização da alma, mencionou certo líquido no cérebro. Pacchioni (1729) afirmou que uma linfa se localizava entre a membrana mole e as circunvoluções do cérebro, porém não forneceu provas objetivas. Cotugno (1764), em seus estudos em peixes e répteis, foi aquele que pela primeira vez demonstrou que um líquido claro preenchia os ventrículos e os espaços subaracnóides, estabelecendo definitivamente que o LCR estava presente no crânio em condições normais²².

Magendie (1822) fez a primeira descrição completa do LCR afirmando que a sua função era protetora do SNC em aspectos mecânicos, devido à distribuição das forças de pressão para todo o crânio, idéia ainda considerada verdadeira em nossos tempos²³.

Quincke (1891) foi o primeiro a fazer a punção lombar no homem com finalidade diagnóstica, com uma simples agulha e sem incisão da pele. Ele abriu assim um novo campo para as pesquisas práticas e teóricas sobre o LCR²³.

A análise do LCR era baseada no exame microscópico de células e medidas semiquantitativas das proteínas totais. Deste modo tornou-se possível a distinção entre meningite/meningoencefalite bacteriana e não bacteriana^{11,25}.

No Brasil, os estudos sobre o LCR iniciaram-se no ano de 1897, seis anos depois das descrições de Quincke. Miguel Couto realizou pela primeira vez em nosso país a punção lombar, em um paciente do Hospital da Misericórdia do Rio de Janeiro. Neste mesmo ano, Correa defendia a tese intitulada “Valor diagnóstico e therapeutico da punccção lombar” no Rio de Janeiro²³.

A distinção das células no LCR, com técnicas envolvendo métodos da citogênese, tornou possível identificar células específicas, como linfócitos, células plasmáticas e células B ativadas. Concluiu-se que estas células alcançavam o tecido do SNC provindas da migração da circulação sistêmica,

através da barreira hemato-LCR. Estas células seriam responsáveis pela produção de imunoglobulinas²⁵.

O desenvolvimento da reação coloidal foi de grande ajuda no diagnóstico de doenças inflamatórias crônicas do SNC²⁵. Graças à eletroforese em papel^{24,26}, foi possível demonstrar que um aumento da gamaglobulina total leva a uma disfunção do equilíbrio coloidal. A diferenciação entre a produção de imunoglobulinas no soro sanguíneo e da produção intratecal ainda não era possível, e por isso esta técnica não teve um valor diagnóstico imediato.

Após ter se tornado claro que havia uma distinta correlação entre a concentração das proteínas do LCR e do soro, a análise destas concentrações se tornou mandatória para determinar a proporção de imunoglobulinas, que eram produzidas dentro do SNC^{27,28}.

Uma vez que a albumina somente é sintetizada no fígado e não é catabolizada dentro do SNC, a razão LCR/soro da albumina foi considerada como um marcador puro de permeabilidade da barreira hemato-LCR. Correlacionando a razão imunoglobulina do LCR e soro com a razão de albumina do LCR e soro, foi possível compensar a quebra da barreira^{27,28}.

Neste contexto, várias fórmulas foram propostas para o cálculo da produção intratecal de imunoglobulinas^{28,29,30,31}. Estas fórmulas mostraram sensibilidades semelhantes que variam de 50 a 70%. Dentre estas fórmulas a mais utilizada é o índice de IgG.

Depois da introdução do diagrama de razão empírica²⁹, que revelou uma relação não linear entre a razão de imunoglobulina e albumina, uma ilustração gráfica e quantitativa da síntese intratecal de imunoglobulinas tornou-se possível.

Com o auxílio da eletroforese em Agar, Löwenthal et al (1969)²⁴ foram capazes de descrever uma expressiva zona de frações de gamaglobulinas em patologias inflamatórias do SNC. Posteriormente, Laterre et al (1970)³² introduziram o termo “oligoclonal” para denominação destas frações, que mais tarde foi designada de “bandas oligoclonais”.

2.2 Anatomia e fisiologia

O SNC pode ser dividido em quatro compartimentos (Figura 1):

- 1) o sistema vascular;
- 2) o espaço intracelular;
- 3) o espaço extracelular;
- 4) e o compartimento do LCR.

A barreira hemato-encefálica separa o sistema vascular do espaço extracelular do parênquima cerebral. A barreira hemato-LCR separa o sistema vascular do compartimento do LCR. É evidente que todo o

parênquima cerebral não margeia o espaço subaracnóide, havendo áreas próximas do compartimento do LCR e áreas distantes^{33,34}.

Figura 1. Compartimentos do sistema nervoso central
(Adaptado de Felgenhauer 1995³³)

O LCR envolve todo o SNC. Esse revestimento líquido é de extrema importância³⁴:

- 1) Para a proteção mecânica do sistema nervoso, em relação a forças normais (como a gravitacional), quer em relação a forças não-fisiológicas (como no traumatismo crânio encefálico);
- 2) Para a rápida difusão de substâncias entre as diferentes estruturas com as quais está em contato, sejam endógenas sejam medicamentos injetados dentro do sistema do LCR;
- 3) Para a homogeneização das respostas de defesa, quando o SNC é acometido por processos infecciosos, como nas meningites e nas encefalites.

Os sistemas de barreiras são importantes para a manutenção das propriedades individuais de cada tecido, sendo que neste contexto as células endoteliais representam o principal papel. Associado às membranas basais dos tecidos, as “tight-junctions” estão relacionadas a permeabilidade seletiva entre o parênquima e o sangue^{11,34}.

Morfologicamente, a barreira hemato-encefálica e a barreira hemato-LCR diferem-se na estrutura de densidade, que é responsável pela exclusão ou permeabilidade de uma determinada substância. Enquanto a barreira hemato-encefálica não mostra qualquer permanente fenestração, a barreira hemato-LCR (plexos coróides) possui diversas fenestrações e vesículas pinocíticas, que formam um macro filtro de proteínas^{11,34}.

A Figura 2 mostra as estruturas anatômicas que estão relacionadas com o fluxo do LCR no SNC.

Figura 2. Compartimentos do líquido cefalorraquidiano

2.3 A coleta do LCR

A obtenção do LCR, com o propósito de diagnóstico, só pode ser indicada após ter se considerado potenciais contra-indicações. Antes da coleta, é necessário obter um consentimento livre e esclarecido, assinado pelo paciente ou por seu responsável legal³⁵.

O LCR é extraído por uma das três vias; lombar (por punção do fundo de saco dural), suboccipital (por punção da cisterna magna), e ventricular (por punção de um dos ventrículos laterais).

Na rotina, esta indicada a punção lombar devido às mínimas complicações. A punção para a obtenção do LCR esta contra indicada em condições clínicas como^{23,34}:

- 1) Hipertensão intracraniana
- 2) Terapia com anticoagulantes;
- 3) Doenças sistêmicas que interferem com a coagulação;
- 4) Processos inflamatórios infiltrativos (infecções, neoplasias) da pele ou do trajeto da área de punção;
- 5) Patologias degenerativas ou malformações da coluna lombar;
- 6) Condições estruturais devido à manipulação cirúrgica;
- 7) Sinais de lesões compressivas medulares, com risco de agravar o déficit neurológico;

2.4 A análise do LCR

A coleta do LCR é facilmente realizada e fundamental para o diagnóstico das doenças infecciosas, inflamatórias e neoplásicas.

A metodologia adequada para análise do LCR, com estudo em paralelo do soro, encontra-se esquematizada na Figura 3.

Figura 3. Organograma da análise do líquido cefalorraquidiano (Adaptado de Zetl UK, Tumani H, 2005¹¹)

A rotina da análise do LCR deve conter^{11,23,34}:

2.4.1 Exame físico

- 1) Medida de pressão antes e após a coleta;

Valor de referência (VR): 5 a 25 cm de H₂O, paciente deitado para a pressão inicial e 50% desse valor para a pressão final;

- 2) Aspecto – VR: límpido, transparente;

- 3) Cor – VR: incolor.

2.4.2 Exame citológico

- 1) Citologia global – VR: até 4 células/mm³, ausência de hemácias;

- 2) Citologia diferencial – VR: perfil linfomonocitário, com expressivo predomínio de linfócitos (80 a 90%);

- 3) Imunocitologia – VR: ausência de linfócitos ativados, neutrófilos, eusínófilos, plasmócitos, células atípicas ou neoplásicas;

2.4.3 Exame químico de rotina

- 1) Proteínas totais – VR: 15 a 40 mg/dl lombar; 15 a 27 mg/dl subocipital;

- 2) Glicose – VR: 50 a 70% da glicemia;

- 3) Lactato – VR: 9 a 19mg/dl;
- 4) Reações de Pandy e Takata-Ara – VR: negativa;
- 5) Pesquisas com pouca utilidade prática, mas que podem ser incorporadas na rotina: cloreto; uréia; atividade enzimática de TGO, DHL, ADA.

2.4.4 Análise quantitativa das proteínas^{2,3,11,34} :

2.4.4.1 A albumina

A avaliação da função da barreira hemato-LCR (termo mais apropriado para este contexto) consiste na análise da razão LCR/soro de albumina, uma vez que esta proteína não é produzida ou catabolizada no SNC, e com isto se torna um marcador de permeabilidade. A coleta conjunta, para análise em paralelo do LCR e soro, é necessária para determinar o quociente de albumina. A análise é realizada por nefelometria. O valor de referência deve ser avaliado na dependência da idade do paciente:

- 1) $< 5 \times 10^{-3}$ até 20 anos;
- 2) $< 6,5 \times 10^{-3}$ até 40 anos;
- 3) $< 8,0 \times 10^{-3}$ acima de 40 anos.

2.4.4.2 As imunoglobulinas^{2,3,11,34}

A análise da IgG é parte essencial do programa básico de pesquisa. A análise da IgA e IgM fornecem informações adicionais no diagnóstico de doenças inflamatórias agudas do SNC.

Assim como na albumina, a coleta conjunta e o estudo em paralelo do LCR e do soro são condições essenciais. Os valores de referência para o quociente de IgG são dependentes da integridade da barreira hemato-LCR e com isto não há efetividade a tentativa de estipular valores.

Para uma correta interpretação deve ser correlacionado o quociente de IgG com o quociente de albumina, razão esta determinada como índice de IgG:

$$\text{Índice de IgG} = \frac{\text{Quociente de IgG}}{\text{Quociente de Alb}} \quad \text{VR: } < 0,8$$

A melhor avaliação é orientada pela aplicação de gráficos de razões empíricas (normogramas), nos quais a razão LCR/soro de IgG, IgA e IgM são correlacionados com o quociente de albumina, que é parâmetro de função da barreira (Figura 4).

Figura 4. Normograma de acordo com Reiber e Felgenhauer²⁹

Nesta representação gráfica poderemos constatar não somente a presença de imunoglobulinas no SNC, mas também correlacioná-las com as imunoglobulinas do soro (Q_{IgG}), e desta forma excluir a passagem passiva pela barreira hemato-LCR. Ainda existe a correlação da concentração da albumina no LCR com a do soro (Q_{Alb}), que é marcador de integridade da barreira hemato-LCR²⁹.

A concentração de albumina no LCR sofre influência com a idade do paciente. O gráfico mostra o início da quebra de barreira conforme essa variante.

No gráfico de razões empírica podemos identifica cinco padrões específicos²⁹:

- I. Normal
- II. Síntese intratecal de IgG (padrão encontrado na EM);
- III. Leve disfunção da barreira hemato-LCR (p.ex. síndrome de Guillain Barré);
- IV. Combinação de II e III (p. ex. neuroborreliose)
- V. Severa disfunção da barreira hemato-LCR (p. ex. meningite purulenta)

Quase todas as doenças inflamatórias do SNC são primariamente caracterizadas pela síntese de IgG, e por isso essa síntese não é patognomônica de uma determinada patologia. Para isso deve ser complementado o estudo com a pesquisa de anticorpos específicos, utilizando métodos apropriados³⁴.

2.4.5 Análise qualitativa das proteínas – pesquisa de bandas oligoclonais (BOC)

Técnicas de análise qualitativa, baseadas em procedimento eletroforético, são de grande sensibilidade para investigar a produção

intratecal de imunoglobulinas, indicando atividade clonal restrita de células B^{2,3,8,11,34}.

Diversos métodos e modificações, com graus variados de sensibilidade e especificidade, têm sido descrito para a demonstração de BOC no LCR. A eletroforese de proteínas em gel de agarose, Agar gel e acetato de celulose são métodos que requerem grande volume de LCR, que deve ser concentrado e ultrafiltrado. Uma parcela expressiva de proteínas pode ser perdida durante esse processo, ou também perder sua propriedade migratória³.

A mais válida técnica atualmente utilizada é a focalização isoeletrica (FIE)^{3,13,34}. Esta técnica consiste na formação de um gradiente de pH, que é gerado e mantido no gel por anfólitos sintéticos (tampões que aderem à agarose e que têm pontos isoeletricos diferentes). Proteínas não concentradas do LCR, colocadas neste gradiente, irão migrar eletroforeticamente até que alcancem seus pontos isoeletricos, onde as proteínas serão focadas. A FIE ainda permite que pequenas quantidades de proteínas se concentrem em bandas justas.

Além da técnica de separação das proteínas, os métodos de visualização das imunoglobulinas assumem especial importância^{3,8,11,13}.

As técnicas de imunodeteção são atualmente mais empregadas, por serem métodos que visualizam especificamente bandas de IgG. Outras técnicas, como a impregnação pela prata, mesmo utilizando a FIE, visualizam todas as classes de imunoglobulinas (IgA, IgM, IgD), cadeias

livres de kappa leve ou lambda, além de outras proteínas derivadas do SNC que eventualmente estejam presentes na faixa das imunoglobulinas, podendo fornecer falsos positivos^{3,44}.

A definição de presença de BOC consiste na comprovação da presença de dois ou mais clones de imunoglobulinas presentes no LCR e ausentes no soro. Na análise dos resultados, seis diferentes padrões são encontrados (Figura 5)^{8,11,13}:

Figura 5 – Interpretação dos resultados das bandas oligoclonais de imunoglobulinas (IgG)

Os padrões dos resultados da pesquisa de BOC são:

- I. Nenhuma banda de IgG no LCR;
- II. BOC restritas ao LCR;
- III. BOC restritas ao LCR com adicionais bandas idênticas no LCR e soro;
- IV. Padrões de bandas idênticos no LCR e soro;
- V. Bandas monoclonais no LCR e soro;
- VI. Bandas de IgG apenas no soro.

Apenas os padrões II e III representam síntese intratecal de IgG.

No último painel internacional de especialistas, para consenso e recomendações da análise do LCR¹³, considerou-se a FIE seguido do immunoblotting a técnica padrão ouro para a pesquisa de BOC.

A grande utilidade deste método levou a sua inclusão nos critérios de diagnóstico da EM¹². Deve ser considerada a condição de que nas populações de alta prevalência da doença, a pesquisa de BOC tem uma sensibilidade em torno de 95%^{3,11,13}. Torna-se um marcador do processo inflamatório da EM que permite utilizá-lo como recurso diagnóstico imprescindível.

Quando positivo em pacientes com síndrome clínica isolada (CIS) é possível concluir que a lesão observada na imagem de ressonância

magnética (IRM) é decorrente de um processo inflamatório, direcionando o diagnóstico da EM¹⁴.

Tintoré M, et al (2008)³⁶ descrevem uma coorte de 113 pacientes, acompanhados por um período de 45 meses. Pacientes com CIS e ausência de lesões a IRM apresentam nesse período 23% de conversão para EM, quando as BOC estavam presentes, e apenas 4% evoluem para EM, quando as BOC estavam ausentes. Quando as lesões a IRM estavam presentes, o estudo das BOC aumentou consideravelmente a sensibilidade para o diagnóstico. A pesquisa ainda concluiu que as CIS com presença de BOC têm a chance dobrada de apresentarem um segundo surto, independentemente das IRM.

2.5 Alterações do LCR na EM

A EM não possui um marcador patognomônico, clínico ou paraclínico, que forneça prova inequívoca da doença¹³.

A análise do LCR, contudo, pode fornecer uma combinação de diversas características físicas, químicas e citológicas, que em conjunto fornecem grandes subsídios para o diagnóstico.

Na EM é descrito um padrão relativamente constante de alterações, em relação ao que ocorre em outras doenças inflamatórias:

- 1) O número de células costuma ser normal ou pleocitose discreta, geralmente abaixo de 30 células/mm³, com predomínio absoluto de células linfomononucleares^{3,11};
- 2) O teor de proteínas totais costuma ser normal ou apresentar aumento discreto, geralmente abaixo de 70 mg/dL^{8,37};
- 3) O quociente de albumina é frequentemente normal (abaixo de 8×10^{-3}) ou levemente aumentado (entre $8 - 10 \times 10^{-3}$), indicando ausência ou discreta disfunção da barreira hemato-LCR^{11,37};
- 4) Existe síntese aumentada de IgG intratecal, constada por provas quantitativas (índice de IgG, diagrama de razões empíricas), que permanece inalterada durante todo o curso da doença^{3,38};
- 5) A síntese de imunoglobulinas IgA e IgM podem estar presentes na EM, porém nunca devem ser dominantes^{2,39,40};
- 6) A síntese aumentada de IgG também é constatada pela presença de BOC restritas ao LCR¹³.

Em acréscimo, a EM costuma revelar um padrão peculiar de apresentação das BOC:

- 1) As BOC não desaparecem durante todo o curso clínico da doença^{3,8};
- 2) As BOC não apresentam relação com os períodos de exacerbação dos sintomas clínicos^{8,11};

- 3) Não é habitual a presença de BOC simultaneamente no LCR e no soro, mesmo que seja identificado maior número de bandas no LCR^{8,41};
- 4) É detectado maior número de BOC, em comparação com outras doenças inflamatórias do SNC^{11,41};

Achados diferentes devem suscitar dúvidas quanto ao diagnóstico da EM, devendo o investigador insistir na procura de outras doenças.

2.6 A demografia e a interpretação dos resultados

São registradas grandes variações, nas diferentes populações, quanto à frequência de BOC em pacientes com EM.

Nos países nórdicos europeus é descrito a sensibilidade das BOC para o diagnóstico da EM que oscila entre 90 a 95%^{14,19,42,43,44}, enquanto que no sul europeu nota-se certa redução de sua frequência, variando entre 65 a 90%^{20,45,46,47,48,52,53}. Esta tendência também se registra na América do Norte, onde Canadá⁶⁰ e norte dos Estados Unidos⁴¹ são descritas maior frequência da doença do que no sul dos Estados Unidos⁶⁴. Não encontramos trabalhos de frequência de BOC descritos no México. Em países orientais como Japão^{6,56,58} e China^{21,55}, a frequência de BOC tende a ser menor, variando entre 40 a 70%.

Poucos estudos, elaborados com metodologias apropriadas, são relatados em outras partes do mundo. Registros mostram a tendência de

declínio, em comparação com as áreas de alta prevalência da doença, com frequências de 40% no Líbano⁵⁷, 30% na Índia⁵⁹ e 3% em Formosa⁶³ (Tabela 1).

Tabela 1. Estudo da presença de BOC em pacientes com EM em diferentes populações.

País	Método	% de BOC +			Referências
		EM	DNI	Controle	
Noruega	FIE IF	100%		9%	Lunding J et al 2000 ¹⁹
Áustria	FIE IB	99%	68%	70%	Mayringer I et al 2005 ⁷⁹
Sérvia e Mont.	FIE IF	96%			Drulovic J et al 1995 ⁴²
Eslovênia	FIE IF	95%			Rot et al 2008 ¹⁴
Noruega	FIE IB	93%	67%	4%	Mygland A et al 2007 ⁴³
EEUU	FIE IB	90%		15%	Fortini AS et al 2003 ⁴¹
Dinamarca	FIE IB	89%	25%	0%	Sellebjerg F et al 1996 ⁴⁴
Canadá	FIE IF	89%			Siritho S et al 2009 ⁶⁰
Itália	FIE	89%			Annunziata P et al 2006 ⁴⁵
Espanha	FIE IB	87%	52%	17%	Falip M et al 2001 ²⁰
França	FIE	85%	21%	8%	Bourahoui A et al 2004 ⁴⁶
Turquia	FIE IP	86%			Idiman E et al 2009 ⁴⁷
Portugal	FIE IF	82%	40%	3%	Sá MJ et al 2005 ⁴⁸
África do Sul	NR	82%			Bhighee A et al 2007 ⁴⁹
Rep. Checa	FIE IB	81%		7%	Bednarova et al 2005 ⁵⁰
França	FIE IF	78%		7%	Fromont A et al 2005 ⁵²
Holanda	FIE IF	77%			Koch M et al 2007 ⁵¹
Espanha	FIE IP	74%		0%	Miró J et al 1992 ⁵³
Austrália	FIE	66%	23%		Wu JS et al 2008 ⁵⁴
China	FIE IP	63%	47%	4%	Li B et al 2007 ⁵⁵
Japão	FIE IF IP	56%			Fukazawa et al 1998 ⁶
Japão	FIE EGA	55%			Nakashima I et al 2002 ⁵⁶
China	NR	40%			Lau KK et al 2002 ²¹
Líbano	NR	40%			Yamout B et al 2008 ⁵⁷
Japão	FIE	33%			Tanaka K et al 2005 ⁵⁸
Índia	NR	30%			Syal P et al 1999 ⁵⁹
Tailândia	NR	21%			Siritho S et al 2007 ⁶¹
Cingapura	NR	21%			Das A 1998 ⁶²
Formosa	FIE	7%	0%		Chang KH et al 2006 ⁶³

Legendas: BOC (bandas oligoclonais); DNI (doenças neurológicas inflamatórias); FIE (focalização isoelétrica); IB (immunoblotting); IF (imunofixação); IP (impregnação pela prata); EGA (eletroforese em gel de agarose); NR (não referido).

No Brasil, dois estudos de Puccioni-Sohler M, et al (1999)⁶⁵ (2001)⁶⁶, descrevem em ambos a frequência de 85% de BOC, em pacientes com EM. Brandão CO et al, também em dois trabalhos (2005)⁶⁷ (2006)⁶⁸, registram a frequência de 91% e 84% respectivamente. Alves-Leon SV, et al (2008) já registram menor frequência de BOC, 64% em uma série carioca de pacientes com EM.

Resultados mundiais tão divergentes provavelmente se devem a um ou mais dos seguintes fatores:

2.6.1 Variações na apresentação clínica ou fase evolutiva da EM.

A fase evolutiva pode influenciar o aparecimento de BOC. É descrita a frequência de 30 a 60% de BOC em pacientes com o primeiro episódio desmielinizante, ou CIS^{14,36}. Críticas podem ser tecidas neste contexto, uma vez que nesta condição, o diagnóstico da EM ainda não está estabelecido, e as manifestações sindrômicas podem corresponder a outras entidades nosológicas.

As formas clínicas da EM também podem influenciar no estudo de BOC. Algumas entidades sindrômicas podem manifestar diferenças fisiopatogênicas com a forma clássica da EM, e podem mascarar os resultados. Exemplo disto é a forma óptico espinal da EM, descrita em países orientais. É descrito baixa frequência de BOC nessa forma clínica^{56,69,70}. Quando pacientes com esse diagnóstico são incluídos com

pacientes portadores da forma clássica da EM, a frequência de BOC nessas amostras tende a baixar.

2.6.2 Constituição genética de cada população, com maior ou menor grau de miscigenação.

A susceptibilidade genética é um fator reconhecido no desencadeamento da EM^{1,4,5,6}. Uma vez que este fator influencia os mecanismos fisiopatogênicos, é plausível esperar que marcadores de atividade inflamatória possam também sofrer influências^{5,6,70}.

Estudos em países orientais confirmam a baixa frequência de BOC, registrada naquelas populações. A Tabela 1 mostra estes dados.

Os afrodescendentes também apresentam uma “proteção genética” para o desencadeamento da EM. Baixos são os registros da doença em países africanos⁴⁹, na população afrodescendente européia⁷¹, norte americana^{5,72,73,74,75} e sul americana⁷⁶. De especial interesse são as manifestações clínicas evolutivas desses pacientes, que apresentam uma forma mais agressiva da doença^{74,75,76,77}.

Diante destas manifestações clínicas, é também aceitável esperar diferenças nos marcadores de inflamação. Rinker JR et al (2007)⁷², em um estudo norte americano, descrevem que apesar de baixa incidência de afrodescendentes portadores de EM, existe uma maior concentração de imunoglobulinas no LCR desses pacientes, mensuradas por técnicas

quantitativas (índice de IgG e razão de síntese de IgG) e pela maior presença de BOC.

2.6.3 Diferenças na metodologia de pesquisa.

Para o estudo de BOC, ainda não é possível automatizar os resultados. A leitura da focalização isoelétrica das proteínas do LCR e do soro é feita visualmente. Por isso, o momento da leitura é um evento de suma importância, não devendo sofrer qualquer forma de influência que possa modificar os resultados^{3,11,34}.

Contrariamente a alguns exames subsidiários, em que dados semiológicos podem contribuir com a interpretação dos resultados, a leitura de BOC deve ser isenta de qualquer forma de informação³.

No que se refere à pesquisa clínica, esta orientação ainda se torna mais incisiva e até certo ponto óbvia. A metodologia dos ensaios clínicos deve possuir um rigor que garanta não só a análise cega das amostras de LCR, como também no oposto da pesquisa, a seleção de candidatos não deve ser influenciada pelos resultados dos estudos do LCR.

A não observação destas recomendações, inevitavelmente levará a vieses que influenciarão os resultados.

2.6.4 Diferentes técnicas de análise do LCR empregadas

Como descrito anteriormente, existem vários métodos baseados em procedimento eletroforético para constatação da presença de BOC. Além dos métodos de separação, as técnicas de visualização das proteínas também possuem grande importância. Diversas revisões sobre o assunto constatarem diferentes graus de sensibilidade e especificidade nas diversas técnicas^{19,43,52,78,79,81}.

Reunião de consenso de especialistas em painel internacional recomenda a técnica da FIE seguida do immunoblotting¹³.

Os diferentes métodos aplicados nos diferentes ensaios clínicos podem explicar a grande variabilidade dos resultados.

3 OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

1. Determinar a sensibilidade do estudo de BOC para o diagnóstico da EM, utilizando a técnica da focalização isoelétrica seguida do immunoblotting, em pacientes atendidos em Hospital Universitário de São Paulo, serviço de referência para diagnóstico e tratamento da EM;
2. Determinar a especificidade desse método, comparando com dois grupos controles: doenças neurológicas inflamatórias e pacientes sem doenças neurológicas.
3. Comparar esses resultados com características clínicas e demográficas dessa população.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4. CASUÍSTICA E MÉTODOS

O presente estudo clínico - laboratorial foi realizado a partir da seleção de pacientes admitidos do Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e do centro cirúrgico dessa mesma instituição, durante o mesmo período.

Os pacientes foram divididos em quatro grupos:

Grupo 1: Pacientes portadores de EM, em suas quatro formas clínicas.

Grupo 2: Pacientes que apresentaram o primeiro episódio clínico indicativo de evento desmielinizante ou CIS.

Grupo 3: Grupo controle de pacientes com doenças neurológicas inflamatórias.

Grupo 4: Grupo controle de pacientes sem queixas neurológicas, admitidos na clínica cirúrgica, e que se submeteram a pequenas cirurgias que exigiram anestesia raquidiana.

4.1 Critérios de inclusão e exclusão

4.1.1 Critérios de inclusão para o grupo de pacientes portadores de EM e CIS:

- 1) Sinais e sintomas neurológicos compatíveis com diagnóstico clínico de EM ou CIS, segundo critérios do painel internacional de McDonald, revisado em 2005.
- 2) Confirmação por meio de IRM, conforme protocolo de imagem da pesquisa.
- 3) Ausência de doenças infecciosas ou outras doenças inflamatórias, rastreada com exames subsidiários, conforme protocolo da pesquisa.

4.1.2 Critérios de inclusão para o grupo de pacientes portadores de doenças neurológicas inflamatórias (DNI):

1) Os pacientes devem apresentar sinais e sintomas neurológicos compatíveis com diagnóstico clínico de DNI classificadas como:

- a) Neuromielite óptica ou doença de Devic;
- b) Encefalomielite disseminada aguda ou ADEM;
- c) Mielopatia inflamatória monofásica ou recorrente;
- d) Neurite óptica recorrente;
- e) Vasculite primária do SNC ou secundária a doenças do colágeno;
- f) Infecções crônicas do SNC.

2) Os pacientes devem apresentar exame de IRM compatível com DNI, conforme previsto no protocolo da pesquisa.

3) Os pacientes devem apresentar exames laboratoriais que suportem o diagnóstico de DNI, conforme previsto no protocolo da pesquisa.

4.1.3 Critérios de inclusão do grupo de pacientes com ausência de doenças neurológicas.

1) Ausência de sinais de envolvimento do SNC;

2) Ausência de infecções sistêmicas.

4.1.4 Critério de exclusão

Critério de exclusão usado para todos os pacientes:

Ter realizado anteriormente exame de LCR, com pesquisa de BOC.

A anuência para a realização do estudo por parte dos pacientes, ou seus responsáveis legais (para pacientes menores de idade ou sem condições neurológicas de compreender os termos do estudo), foi obtido mediante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido Para pacientes do ambulatório de doenças desmielinizante foi utilizado o Anexo 1 e para indivíduos do grupo controle foi utilizado o Anexo 2.

4.2 Protocolo da avaliação clínica para pacientes portadores de EM

As informações sobre os dados demográficos, quadro clínico e evolutivo dos pacientes portadores de EM foram coletados seguindo o Protocolo Clínico Pré-Estabelecido (Anexo 3):

4.2.1 Dados demográficos

Foram coletadas informações sobre:

- 1) Idade;
- 2) Gênero;
- 3) Naturalidade e procedência;
- 4) Grupo étnico.

Devido ao alto grau de miscigenação da nossa população, a distinção da etnia é um assunto muito complexo. O método utilizado para esta pesquisa foi o preconizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)⁸⁰, aplicado desde o Censo de 2000. Para a distinção de raça/cor (termo melhor empregado) os pacientes se autodeclararam de cor:

- a) Amarela;
- b) Branca;
- c) Indígena;

d) Parda;

e) Preta.

4.2.2 Quadro clínico

O quadro clínico envolveu:

- 1) Idade ao início dos primeiros sintomas;
- 2) Modo de início: monossintomático ou polissintomático;
- 3) Sintomas iniciais: foram coletadas informações sobre a presença dos sintomas neurológicos da primeira manifestação: déficit motor; sensitivo; cerebelar; tronco encefálico; esfíncteres; sintomas da neurite óptica e sintoma de Lhermitte;
- 4) Sintomas no curso da doença: os acima pesquisados além de: fadiga; intolerância ao calor; dor; crises espásticas; sintoma de Uhthoff; depressão; declínio cognitivo e psicose;
- 5) Forma evolutiva da doença: recorrente-remitente; secundariamente progressiva; primariamente progressiva; progressiva recorrente;
- 6) Duração da doença: considerado tempo decorrente entre a idade ao início dos sintomas e a idade ao último exame;
- 7) Intervalo entre o primeiro e o segundo surto;
- 8) Número de surtos durante o primeiro ano; durante os três primeiros anos; durante os cinco primeiros anos;

- 9) Tempo de conversão entre as formas recorrente-remitente e secundariamente progressiva;
- 10) Grau de incapacidade ao ingresso na pesquisa, medido pela escala de status da incapacidade expandida de Kurtzke (EDSS) fora do surto;
- 11) Intervalo entre os primeiros sintomas e o grau de incapacidade: tempo para atingir os graus de incapacidade: EDSS 4; EDSS 6; EDSS 7 e EDSS 8;
- 12) Tratamento profilático: se o paciente faz uso de tratamento profilático e ano de início;
- 13) Tratamento profilático utilizado:
 - a) Imunomoduladores: betainterferona la 30mc/semana; betainterferona la 22mc ou 44mc/3x por semana; betainterferona lb 8 MUI dias alternados; acetato de glatirâmer 20mg diariamente;
 - b) Imunossupressores: corticosteróides; azatioprina; metotrexate; mitoxantrone; ciclofosfamida; imunoglobulina.
- 14) Formas familiares: presença ou não de formas familiares da doença e grau de parentesco do acometido: irmão; pais; filhos; primos de primeiro grau; tios/sobrinhos.

4.3 Protocolo da avaliação clínica para pacientes portadores de DNI

Para o grupo de pacientes portadores de DNI foram pesquisados:

4.3.1 Dados demográficos:

- 1) Idade;
- 2) Gênero;
- 3) Grupo étnico: determinado de acordo com a autodeclaração dos pacientes⁸⁰ em cor:
 - a) Amarela;
 - b) Branca;
 - c) Indígena;
 - d) Parda;
 - e) Preta;

4.3.2 História clínica:

- 1) Tempo de início dos primeiros sintomas;
- 2) Primeiros sintomas;
- 3) Sintomas no decorrer da doença;
- 4) Tempo de evolução da doença;
- 5) História familiar.

4.3.3 Exame físico neurológico.

O exame físico neurológico foi realizado seguindo a rotina do ambulatório de doenças desmielinizantes do HC-FMUSP.

4.4 Protocolo dos pacientes do grupo controle

Os constituintes deste grupo foram recrutados entre aqueles pacientes que se submeteram a anestesia raquidiana para procedimentos cirúrgicos diversos no centro cirúrgico do HCFMUSP. Foram excluídos pacientes com quadros infecciosos.

4.5 Protocolo de exames complementares.

Na primeira avaliação foram solicitados exames complementares para apoiar o diagnóstico da EM e para exclusão de doenças passíveis de diagnósticos diferenciais^{17,18}. O protocolo investigativo também direcionou a confirmação do diagnóstico de DNI.

4.5.1 Os exames bioquímicos e sorológicos solicitados foram:

- 1) Hemograma;
- 2) Velocidade de hemossedimentação;
- 3) Uréia e creatinina;
- 4) Transaminases,
- 5) Bilirrubinas totais e frações;
- 6) Glicemia;
- 7) Cálcio;
- 8) Tiroxina livre e hormônio tireo-estimulante;
- 9) Proteína C reativa;
- 10) Fator antinúcleo e suas frações quando alterado;
- 11) Prova do látex,
- 12) Frações 3 e 4 do complemento,
- 13) Anticorpos anticardiolipina das classes IgM e IgG;
- 14) Pesquisa do anticoagulante lúpico;
- 15) Dosagem de cianocobalamina e folato;
- 16) Imunologia para sífilis,
- 17) Imunologia para hepatite B e C,
- 18) Imunologia para o HIV;
- 19) Imunologia para o HTLV.

- 20) Exames adicionais foram solicitados em casos específicos, quando necessário.

4.5.2 Exame de neuro-imagem

Os pacientes foram submetidos a exame de IRM convencional, realizada no plano axial e pesadas em T1, T2 e FLAIR, e coletadas imagens após administração de contraste paramagnético (gadolínio), pesadas em T1.

Os resultados dos exames foram analisados por radiologistas especializados em neuroimagem e posteriormente reavaliados diante do quadro clínico dos pacientes.

Foram utilizados os seguintes parâmetros para avaliação de imagem:

- 1) Para o diagnóstico de EM ou CIS as imagens devem seguir os critérios de Barkhoff, conforme previstos nos critérios de diagnóstico revisados de 2005¹² (Tabela 2).
- 2) Para o diagnóstico de DNI, as imagens:
 - a) Não devem preencher os critérios de Barkhoff;
 - b) Podem revelar sinais de atividade inflamatória, com quebra da barreira hemato-encefálica, constatada pela captação de gadolínio;
 - c) Devem ser condizentes com os seis diagnósticos descritos nos critérios de inclusão, em conjunto denominados de DNI.

Tabela 2. *Imagens de ressonância magnética no diagnóstico da esclerose múltipla*

3 de 4 critérios:

- 1 lesão Gd-captante **ou** 9 lesões hiperintensas em T2 não Gd-captante
- 1 ou mais lesões infratentoriais
- 1 ou mais lesões justacorticais
- ou mais lesões periventriculares
-

OBS.:

- uma lesão medular equivale a uma lesão infratentorial;
 - uma lesão medular captante equivale a uma lesão cerebral captante;
 - uma lesão medular pode ser somada às lesões cerebrais para alcançar o número de lesões em T2
-

critérios de Barkhoff, revisados em 2005¹²

4.5.3 Protocolo de análise das variantes clássicas do LCR

O estudo do LCR foi solicitado após preenchimentos dos critérios clínicos e de IRM que confirmaram o diagnóstico.

O exame do LCR foi realizado de acordo com a rotina clássica:

- 1) Exame físico: aspecto; cor;
- 2) Exame citológico: contagem global e diferencial de células;
- 3) Exame químico: glicorraquia; dosagem de lactato; proteínas totais; reação de Pandy e Takata-Ara;

- 4) Reações imunológicas para cisticercose; sífilis; HTLV; HIV e toxoplasmose;
- 5) Em casos específicos frente a suspeita clínica, foram solicitadas reações imunológicas específicas, pesquisa de material antigênico e PCR.

4.5.4 Protocolo para a análise quantitativa das proteínas do LCR

Em todos os pacientes foram feitos exames simultâneos de LCR e de soro sanguíneo. O sangue foi coletado no momento da punção lombar.

Foram feitos estudos para investigação de imunoprodução intratecal quantitativa de IgG. Para tanto, foram determinadas as concentrações por nefelometria de IgG e de albumina, no soro e no LCR. A seguir, foram determinados:

- 1) Os quocientes de albumina e de IgG (razão entre os teores dessas variáveis no LCR e no soro) e considerado elevado quando:
 - a) 5×10^{-3} para idade inferior a 20 anos;
 - b) $6,5 \times 10^{-3}$ para idade inferior a 40 anos;
 - c) 8×10^{-3} quando a idade do paciente superava os 40 anos.
- 2) O índice de IgG (razão entre os quocientes de IgG e de albumina): considerado elevado quando igual ou superior a 0,8;
- 3) O nomograma de Reiber e Felgenhauer.

4.5.5 Protocolo para a análise qualitativa das proteínas do LCR: a pesquisa de BOC.

Foram utilizadas duas técnicas para a determinação das BOC:

- 1) Eletroforese em gel de agarose (Helena Laboratories, Beaumont, Tx, fitas de acetato marca Erviegas, corante Amido Schwartz);
- 2) Focalização isoeletrica (FIE) em gel de polyacrilamida (ETC – Elektrophorese – Technok Bahnhofstr), seguida de immunoblotting.

O estudo da FIE seguiu critérios rigorosos de qualidade em conformidade com as diretrizes e recomendações de especialistas em painel internacional (Freedman M et al, 2005¹³), e seguiram as seguintes etapas:

Cada amostra de LCR e de soro sanguíneo foi realizada FIE em aparelho CWP-400 Isolab Inc. Em cada corrida havia uma amostra-controle positiva.

Após o término da isofocalização, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Bio Agency). A detecção das BOC foi realizada através do método de immunoblotting utilizando: um anticorpo primário (Goat-anti-human IgG, Sigma) e um anticorpo secundário (policlonal rabbit anti-goat immunoglobulins, Dako Cytomation). Posteriormente, foi feita a revelação com 3-amino-9-etilcarbazole (Sigma).

A detecção das BOC foi considerada positiva quando existiam duas ou mais faixas de concentração na fração das imunoglobulinas, estando elas ausentes no soro.

Para maior confiabilidade, a leitura dos resultados foi realizada por dois examinadores que desconheciam o grupo a que pertenciam as amostras de LCR e sangue. Havendo dúvidas ou divergências quanto à interpretação de determinado resultado, a amostra em questão era processada novamente, com nova leitura.

4.6 Fluxograma do atendimento médico

Todos os pacientes foram atendidos no ambulatório de Doença Desmielinizante do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A anamnese e o exame físico foram feitos por ocasião da primeira consulta, sempre pelo mesmo pesquisador, e reavaliados por um segundo pesquisador, ambos neurologista com experiência no diagnóstico de doenças desmielinizantes.

Após a anamnese os pacientes eram encaminhados para realização de exames químicos e sorológicos no Laboratório Central do HC-FMUSP e IRM realizado no Departamento de Radiologia do HC-FMUSP. Para o estudo de IRM foram também utilizados outros serviços de imagem da região.

O exame de LCR foi colhido por um único médico neurologista, do laboratório de LCR do HC-FMUSP, onde foram realizadas provas de rotina. Fração de cada amostra foi encaminhada para o laboratório do Centro de Investigações em Neurológica da FMUSP para realização da eletroforese de proteínas convencional e FIE. Outra fração de LCR foi encaminhada para o laboratório Fleury para realização da nefelometria para dosagem de proteínas.

Após a confirmação do diagnóstico os pacientes receberam a programação terapêutica apropriada, com acompanhamento conduzido segundo a rotina do serviço.

4.7 Análise estatística:

4.7.1 Testes da validade

Foram calculadas a sensibilidade e a especificidade do método de detecção de BOC para o diagnóstico da EM.

Considerou-se como grupo pesquisado o grupo 1 (pacientes portadores de EM) e, como controles, outros dois grupos: o grupo 3 (doenças neurológicas inflamatórias) e o grupo 4 (ausência de doenças neurológicas).

Conceituamos como:

- 1) Verdadeiros positivos (VP) - pacientes com BOC positivas e diagnóstico de EM;
- 2) Verdadeiros negativos (VN) - pacientes com BOC negativas nos dois grupos controles, calculados separadamente;
- 3) Falsos positivos (FP) - pacientes com BOC positivas dos grupos controles, também calculados separadamente;
- 4) Falsos negativos (FN) - pacientes com BOC negativas e diagnóstico de EM.

Cálculos da validade:

- 1) A sensibilidade foi calculada utilizando a razão $VP/VP+FN$;
- 2) A especificidade pela razão $VN/VN+FN$;
- 3) O preditor positivo pela razão: $VP/VP+FP$;
- 4) O preditor negativo pela razão: $VN/VN+FN$;
- 5) A acurácia pela razão: $VP+VN/VP+VN+FP+FN$.

4.7.2 Estatística descritiva:

- 1) Frequências e porcentagens de BOC vs gênero, etnia e formas clínicas da EM;
- 2) Estatísticas sumárias do índice de IgG vs gênero, etnia e formas clínicas;

3) Estatísticas sumárias do índice de IgG vs BOC;

4.7.3 Inferência estatística:

- 1) Testes de homogeneidade de BOC ou vs etnia, gênero e formas clínicas:
 - a) A estatística do teste de homogeneidade utilizado foi o X^2 de Pearson, com 1 e 3 graus de liberdade.
 - b) A rejeição da hipótese H_0 foi verificada quando p-valor (p) do teste for menor que o nível de significância do teste (α)
- 2) Testes de associação das tabelas de classificação cruzada:
 - a) O teste estatístico utilizado em tabelas de classificação cruzada foi o teste de Cochran-Mantel e Haenzel (CMH).
 - b) A estatística do teste CMH foi o X^2 de Pearson, com 1 grau de liberdade.
- 3) O testes de comparação de médias do índice de IgG segundo etnia, gênero, formas clínicas vs BOC foi o teste t de Student.
- 4) O teste de comparação de médias de IgG segundo formas clínicas em 4 níveis foi o teste F de Snedecor.

4.7.4 Software utilizados

- 1) Minitab – statistical software – versão 14
- 2) Microsoft Office Home – versão 2007

4.8 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa do presente estudo teve a aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. A aprovação do estudo de pacientes do ambulatório de doenças desmielinizantes encontra-se no Anexo 6, e a do grupo de indivíduos sem doenças neurológica encontra-se no Anexo 7.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

O presente estudo clínico - laboratorial selecionou 145 pacientes admitidos consecutivamente no período de agosto de 2005 a janeiro de 2008 no Ambulatório de Doenças Desmielinizantes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP) e de 19 indivíduos admitidos no centro cirúrgico dessa mesma instituição, durante o mesmo período. A distribuição da casuística resultou:

- 1) 90 pacientes com EM em suas quatro formas clínicas;
- 2) 16 pacientes com CIS;
- 3) 39 pacientes com doenças neurológicas inflamatórias;
- 4) 19 pacientes sem queixas neurológicas.

5.1 Dados demográficos

5.1.1 Idade

As idades dos 164 pacientes que ingressaram nesta pesquisa assim se distribuíram:

- 1) No grupo de pacientes portadores de EM, a idade variou de 15 a 64 anos, com média de $35,6 \pm 12,1$ anos e mediana de 34 anos.
- 2) No grupo de pacientes portadores de CIS, a idade variou de 17 a 37 anos, com média de $25,4 \pm 8,2$ anos e mediana de 25 anos.
- 3) No grupo de pacientes portadores de doenças neurológicas inflamatórias, a idade variou de 21 a 54 anos, com média de $31,5 \pm 18,4$ anos e mediana de 30 anos.
- 4) No grupo controle a idade variou de 23 a 63 anos, com média de $39,2 \pm 16,2$ anos e mediana de 38 anos.

5.1.2 Gênero

- 1) Dos 90 pacientes portadores de EM, 67 (74,4%) eram do sexo feminino. A razão feminino/masculino foi de 2,9/1.
- 2) Dos 16 pacientes portadores de CIS, 11 (68,7%) eram do sexo feminino, A razão feminino/masculino foi de 2,2/1.
- 3) Dos 39 pacientes portadores de doenças neurológicas inflamatórias, 27 (69,2%) eram do sexo feminino. A razão feminino/masculino foi de 2,3/1.

- 4) Dos 19 pacientes do grupo controle, 13 (68,4%) eram do sexo feminino. A razão feminino/masculino foi de 2,2/1.

5.1.3 Etnia

Da totalidade dos pacientes portadores de EM estudados, 65 se autodeclararam de cor branca, 17 parda, 7 preta e um paciente de cor amarela. Não houve nenhum que se autodeclarou indígena (Figura 6).

Figura 6 - Distribuição da etnia nos diversos grupos de pacientes.

5.2 Quadro clínico

5.2.1 Formas clínicas

As formas clínicas dos 90 pacientes portadores de EM se distribuíram em:

- 1) remitente recorrente (RR) 61 pacientes;
- 2) secundariamente progressiva (SP) 11 pacientes;
- 3) primariamente progressiva (PP) 16 pacientes e;
- 4) progressiva recorrente (PR) 2 pacientes.

A distribuição das formas clínicas da EM distribuídos em porcentagem, encontra-se na Figura 7.

Figura 7 – Distribuição em porcentagem das formas clínicas da esclerose múltipla.

5.3 Análise qualitativa das proteínas do LCR

5.3.1 Estudo de BOC pela FIE em pacientes com EM:

Dos 90 pacientes com EM, 49 apresentaram BOC (54,4%) e 41 apresentaram ausência de BOC (45,6%) no LCR.

5.3.2 Estudo de BOC pela FIE em pacientes com CIS:

Dos 16 pacientes com CIS, 05 apresentaram BOC (31,3%) e 11 apresentaram ausência de BOC (68,7%) no LCR.

5.3.3 Estudo de BOC pela FIE em pacientes com doenças neurológicas inflamatórias (DNI):

Dos 39 pacientes com DNI, 7 apresentaram BOC (17,9%) e 32 apresentaram ausência de BOC (82,1%) no LCR.

A distribuição das características clínicas do grupo de pacientes com DNI e a relação com a presença de BOC, encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas do grupo de pacientes com doenças neurológicas inflamatórias e correlação com a presença de bandas oligoclonais

Doenças inflamatórias do SNC	Número	BOC +	%
Neurite óptica recidivante	2	2	100
Mielopatia pelo HTLV	2	1	50
Esquistossomose	2	1	50
Vasculite no sistema nervoso	15	3	20
Neuromielite óptica	6	0	0
Mielite recidivante	4	0	0
Encefalomielite disseminada aguda	3	0	0
Hepatite B e C	3	0	0
Neurite óptica viral	1	0	0
Sífilis	1	0	0

Legendas: (BOC) bandas oligoclonais pela focalização isoelétrica; SNC (sistema nervoso central); HTLV (vírus T - linfotrópico humano)

5.3.4 Estudo de BOC pela FIE em pacientes sem doenças neurológicas:

No grupo de 19 pessoas sem doença neurológica, nenhum dos indivíduos apresentou BOC.

5.3.5 Estudo de BOC pela FIE em pacientes fazendo uso de terapia imunomoduladora (interferonas ou acetato de glatirâmer):

A positividade das BOC nos pacientes tratados com imunomoduladores foi de 51,2% (21 pacientes). Estavam em tratamento 41 pacientes desta casuística.

5.3.6 Estudo de BOC pela eletroforese em gel de agarose (EGA).

O estudo da EGA mostrou menor sensibilidade para identificar BOC nos diversos processos patológicos:

- 1) EM - 90 pacientes, 21 apresentaram BOC (23,3%);
- 2) CIS - 16 pacientes, 2 apresentaram BOC (12,5%);
- 3) Outras desmielinizantes - 15 pacientes, nenhum apresentou BOC (0%);
- 4) Vasculites do SNC - 15 pacientes, nenhum apresentou BOC (0%);
- 5) Infecções crônicas do SNC - 09 pacientes, 01 apresentou BOC (11,1%);
- 6) Grupo controle sem doenças neurológicas - 19 pacientes, nenhum apresentou BOC.

5.4 Análise quantitativa das proteínas do LCR

5.4.1 O quociente de albumina

O estudo revelou elevação do quociente de albumina em 14,1% dos pacientes com EM, indicando algum grau de disfunção da barreira hemato-LCR.

5.4.2 O Índice de IgG

O índice de IgG apresentou:

- 1) Aumento ($\geq 0,8$) em 47 (52,2%) dos 90 pacientes com EM; média de 1,02 ($\pm 0,67$) e mediana de 0,8;
- 2) Pacientes com CIS revelaram 37,5% de aumento do índice de IgG; média de 0,79 ($\pm 0,36$) e mediana de 0,58;
- 3) No grupo de pacientes com doenças inflamatórias do SNC, houve aumento do índice de IgG em 14 dos 39 pacientes (35,8%). A média foi de 0,70 ($\pm 0,48$) e mediana de 0,77;
- 4) No grupo controle, um dos 19 pacientes apresentou leve aumento do índice de IgG (5,2%). A média foi de 0,52 ($\pm 0,11$) e mediana de 0,50.

Quando se associa o resultado do índice de IgG com a pesquisa de BOC nos pacientes com EM podemos observar:

- 1) Que houve concordância entre presença de BOC e índice de IgG elevado em 37 pacientes com EM (41,1%);
- 2) Quando se considera resultado de LCR alterado (conforme determinado pelo painel internacional de 2005¹²), ou seja, presença de BOC e/ou aumento do índice de IgG, foi possível sua caracterização em 56 dos 90 pacientes (62,2%);

3) A diferença entre as médias do índice de IgG quanto a presença ou não de BOC resultou significativa, com $p < 0,0001$ (Figura 8). O resultado das BOC segundo as médias e os erros padrões do índice de IgG foram:

a) BOC presentes: $1,34 \pm 0,11$ e;

b) BOC ausentes: $0,66 \pm 0,04$.

Figura 8 – Gráfico de intervalos do índice de IgG vs bandas oligoclonais (BOC). Houve efeito significativo ($p=0,0001$)

A Figura 9 mostra o resultado das análises das imunoglobulinas nas diversas patologias.

Figura 9 – Distribuição da análise das imunoglobulinas nas diversas patologias.
Legenda: BOC (bandas oligoclonais); EM (esclerose múltipla); CIS (síndrome clínica isolada); ODD (outras doenças desmielinizantes) que incluem: neuromielite óptica, neurite óptica recidivante, mielite recidivante, encefalomielite disseminada aguda.

5.4.3 O normograma

A distribuição da concentração da imunoglobulina contra a concentração da albumina segundo o normograma de Reiber e Felgenhauer encontra-se representado na Figura 10.

Figura 10. Quociente de imunoglobulina plotado contra o quociente de albumina nos três grupos de pacientes.

5.5 O estudo quimiocitológico de rotina do LCR

As variantes clássicas do estudo do LCR nos pacientes com EM assim se apresentaram:

- 1) A mediana do número de células foi 5, média de 7,8 ($\pm$ 9,3). A contagem de células foi normal em 46,4% ($\leq$ 4 cels/mm³) e aumento de até 30 cels/mm³ em 51,7% dos pacientes;
- 2) A contagem diferencial de células mostrou padrão linfomonocitário em todas as amostras de LCR;
- 3) A média do teor de proteínas totais foi de 31,3 mg/dl ($\pm$ 7,2) e mediana de 28 mg/dl;
- 4) Em 98,1% dos pacientes com EM, o teor de proteínas totais estava abaixo de 72 mg/dl e a contagem total de células estava abaixo de 30 cels/mm³;
- 5) As concentrações de glicose e lactato estavam normais em todos os pacientes.

5.6 Resultado das análises de BOC e do índice de IgG comparados com as características demográficas.

5.6.1 Gênero

Quando se compara a relação do gênero em pacientes portadores de EM, com o resultado da análise qualitativa e quantitativa das IgG do LCR, obtivemos os seguintes resultados:

- 1) 16 dos 23 pacientes do sexo masculino (69,7%) apresentavam BOC;
- 2) 33 das 67 pacientes do sexo feminino (49,3%) apresentavam BOC;
- 3) O teste de não associação entre gênero e presença de BOC mostrou: $\chi^2=2,85$; g.l.=1; $p=0,0915$;
- 4) A média do índice de IgG no sexo masculino foi de 1,08 ($\pm 0,6$), mediana de 0,89;
- 5) A média do índice de IgG no sexo feminino foi de 1,0 ($\pm 0,7$) mediana de 0,76;
- 6) A comparação entre as médias do índice de IgG e os gêneros resultou em: $t= -0,41$; $p=0,68$; diferença= -0,07; erro padrão=0,16; IC(95%): (-0,25; 0,39).

5.6.2 Etnia

Quando analisamos a autodeclaração da cor da pele com o resultado da análise qualitativa e quantitativa das IgG do LCR constatamos que:

- 1) Dos 66 pacientes brancos, 32 (48,5%) apresentaram BOC;
- 2) Dos 22 pacientes negros (cor parda/preta), 16 (72,7%) apresentaram BOC;

- 3) A única paciente amarela apresentou BOC;
- 4) O teste de não associação entre cor e presença de BOC resultou em: $\chi^2=3,54$; g.l.=1; $p=0,0518$; risco relativo $R=0,69$; IC (95%): (0,48; 0,98). A homogeneidade de BOC positivas foi significativa na borda do nível de significância de 5%;
- 5) A média do índice de IgG nos pacientes brancos foi 0,99 ($\pm 0,6$) e mediana de 0,7;
- 6) A média do índice de IgG nos pacientes negros foi 1,1 ($\pm 0,8$) e mediana de 0,9;
- 7) A única paciente amarela apresentou índice de IgG normal;
- 8) A comparação de médias do índice de IgG segundo a cor resultou em: $t= -0,75$; $P=0,46$; diferença= -0,12; erro padrão=0,16; IC (95%): (-0,2; 0,4), não significativa no nível de significância de 5%.

5.6.3 A associação entre gênero e etnia com a presença de BOC

Quando associamos o resultado das análises da pesquisa de BOC pela FIE entre gênero e etnia, obtivemos os seguintes resultados:

- 1) Os 6 pacientes do sexo masculinos e negros apresentaram BOC (100%);
- 2) Dos 17 pacientes do sexo feminino e negras, 10 (58,8%) apresentaram BOC;

- 3) Dos 17 pacientes do sexo masculino e brancos, 10 (58,8%) apresentaram BOC;
- 4) Dos 49 pacientes do sexo feminino e brancas, 22 (44,9%) apresentaram BOC;
- 5) O teste de não associação resultou em: $X^2=3,63$; g.l=1; $p=0,0568$; R comum=0,68; IC(95%) = (0,48;0,97). A associação entre BOC e Cor ajustado por gênero foi significativa na borda do nível de significância de 5%.

A apresentação desta análise apresenta-se esquematizada na figura 11.

Figura 11 - Associação do gênero e etnia dos pacientes portadores de esclerose múltipla, analisados quanto à presença de bandas oligoclonais (BOC). Etnia negra se relaciona aos que se autodeclararam de cor parda/preta. Teste de não-associação: $X^2 = 3,63$; g.l. = 1; $p = 0,0568$

5.6.4 A associação entre gênero e etnia com o índice de IgG

A apresentação gráfica do índice de IgG, quando se relaciona com o gênero e a etnia, encontra-se esquematizada no Figura 12.

Figura 12 - Associação do gênero e etnia dos pacientes portadores de esclerose múltipla analisados quanto ao índice de IgG. Etnia negra se relaciona aos que se autodeclararam de cor parda/preta. Comparação de médias: $t=-0,75$; $p=0,46$; diferença=-0,12; erro padrão=0,16; IC (95%): (-0,2; 0,44). Não significante.

5.7 O quadro clínico e a análise do LCR

5.7.1 As diferentes formas clínicas da EM e a análise do LCR

A distribuição dos resultados da presença de BOC nas diferentes formas clínicas mostrou que:

- 1) Dos 16 pacientes com CIS, 5 (31,2%) apresentaram BOC;

- 2) Dos 61 pacientes com a forma RR da EM, 27 (44,3%) apresentaram BOC;
- 3) Dos 11 pacientes com a forma SP, 6 (54,5%) apresentaram BOC;
- 4) Dos 16 pacientes com a forma PP, 14 (87,5%) apresentaram BOC;
- 5) E os 2 pacientes com a forma PR apresentaram BOC;
- 6) O teste de não associação resultou em: $\chi^2=11,27$; g.l=3; $p=0,0103$,
significante ao nível de significância de 5%.

A apresentação destes dados, distribuídos em porcentagem, encontra-se na figura 13.

Figura 13 – Distribuição da presença de bandas oligoclonais (BOC) pela focalização isoeletrica nas diferentes formas clínicas: síndrome clínica isolada (CIS); remitente recorrente (RR); secundariamente progressiva (SP); primariamente progressiva (PP); progressiva recorrente (PR). Teste de não-associação: $\chi^2 = 11,27$; q.l. = 3; $p = 0,0103$

Quando se considera separadamente a forma remitente recorrente com as formas progressivas e o resultado das BOC, observa-se também expressiva significância estatística (Figura 14).

Figura 14 – Distribuição da presença de bandas oligoclonais (BOC) pela focalização isoeletrica segundo a forma remitente recorrente e as formas clínicas progressivas. Teste de homogeneidade: $\chi^2 = 7,91$; g.l.=1; risco relativo R=0,58; IC(95%); p=0,0049

A apresentação de toda a casuística, com as características demográficas, formas clínicas da doença e o resultado das análises do LCR encontra-se detalhada no anexo 8.

5.7.2 A sintomatologia e evolução clínica e a presença de BOC

Quanto à evolução clínica observamos retardo para alcançar os níveis 4, 6 e 7 do EDSS (escala expandida do estado de incapacidade) no grupo de pacientes com ausência de BOC, apresentando portanto uma forma mais

branda da doença. Ambos os grupos de pacientes contiveram poucos indivíduos que alcançaram o EDSS 6 e 7, não deixando um valor estatístico na interpretação destes resultados. Não houve significância estatística quanto à presença de BOC e os dados clínicos:

- 1) Idade de início dos sintomas;
- 2) Sintomas iniciais;
- 3) Intervalo entre o primeiro e o segundo surto;
- 4) Formas familiares.

Estes dados encontram-se detalhados na Tabela 4.

Tabela 4. Características clínicas dos pacientes com esclerose múltipla e correlação com a presença de bandas oligoclonais.

	BOC +	BOC -
Número de pacientes	49 (54,4%)	41 (45,6%)
Idade de início dos sintomas em anos	29 ($\pm$ 4,9)	26 ($\pm$ 2,1)
Sintomas iniciais:		
Piramidal	37,8%	48,7%
Sensitivo	40,5%	48,7%
Neurite óptica	32,4%	35,8%
Cerebelar	13,5%	15,3%
Tronco	2,7%	7,6%
Esfincteriano	5,4%	7,6%
Intervalo entre o 1º e o 2º surto em meses	32 ($\pm$ 2,7)	33 ($\pm$ 14,8)
Mediana de tempo em meses para atingir:		
EDSS 4	43 ($\pm$ 6,7)	57 ($\pm$ 12,4)
EDSS 6	68 ($\pm$ 8,4)	84 ($\pm$ 33,6)
EDSS 7	88 ($\pm$ 30)	112 ($\pm$ 12)
Formas Familiares	8,3%	8,1%

Legendas: BOC (bandas oligoclonais). EDSS (escala expandida do estado de incapacidade). Valores expressos em mediana, desvio padrão e porcentagem.

5.8 Análises estatísticas

5.8.1 Teste de validade da pesquisa de BOC (FIE e imunoblotting), para o diagnóstico da EM.

- 1) A sensibilidade das BOC foi calculada em 54,4%.
- 2) A especificidade foi de 100%, quando utilizamos para controle o grupo de pacientes com ausência de doenças neurológicas;
- 3) A especificidade foi de 82,1%, quando utilizamos para o controle o grupo de pacientes com doenças inflamatórias do SNC.

Estes dados, juntamente com o cálculo da acurácia e dos valores preditivos positivo e negativo encontram-se da Tabela 5.

Tabela 5 – Valores, em porcentagem, dos indicadores de significância na detecção de bandas oligoclonais para o diagnóstico da esclerose múltipla, pela técnica da focalização isoeletrica e imunoblotting.

BOC na EM	Grupo controle em %	Grupo DISNC em %
Sensibilidade	54,4	54,4
Especificidade	100,0	82,1
Acurácia	77,2	68,2
Valor Preditor Positivo	100,0	75,2
Valor Preditor Negativo	68,6	64,2

Legendas: BOC (bandas oligoclonais); grupo controle (pacientes submetidos a anestesia raquidiana); grupo DISNC (doenças inflamatórias do sistema nervoso central).

5.8.2 Teste de validade da pesquisa de BOC pela eletroforese em gel de agarose.

- 1) A sensibilidade das BOC pela eletroforese em gel de agarose foi de 23,3%;
- 2) A especificidade, utilizando como controle o grupo de pacientes sem doenças neurológicas, foi de 100%;
- 3) A especificidade, quando utilizado para controle o grupo de pacientes com doenças inflamatórias do SNC, foi de 97,4%.

5.8.3 Teste de validade da pesquisa do índice de IgG para o diagnóstico da EM.

- 1) A sensibilidade para o diagnóstico da EM do índice de IgG foi de 52,2%;
- 2) A especificidade, utilizando como controle o grupo de pacientes sem doenças neurológicas, foi de 94,8%;
- 3) A especificidade, quando utilizado para controle o grupo de pacientes com doenças inflamatórias, foi de 82,1%.

O detalhamento das análises estatísticas encontra-se descrito no anexo 9.

6 DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

6.1 – Caracterização da casuística

Os pacientes incluídos no estudo foram selecionados do ambulatório de Doenças Desmielinizante do HC-FMUSP. Controles normais foram recrutados do centro cirúrgico da mesma instituição.

A idade dos pacientes que ingressaram na pesquisa variou de 15 a 64 anos com média de $35,6 \pm 12$ anos, valores adequados ao se considerar uma amostra de pacientes com EM^{20,37,41,45,46}.

Dos 90 pacientes, 74% eram do sexo feminino. A razão feminino/masculino foi de 2,9/1. A distribuição de proporção entre os gêneros desta pesquisa é própria de uma população de pacientes portadores de EM. Encontra-se de acordo com as casuísticas dos ensaios da literatura especializada^{20,37,41,45,46}.

Da totalidade dos pacientes estudados, 72% se autodeclararam de cor branca, 19% de cor parda, 8% de cor preta e uma paciente de cor amarela (1%). Nenhum paciente se autodeclarou indígena. Esta distribuição representa a distribuição da raça/cor da população de nossa região, segundo dados do IBGE. Segundo essa instituição a distribuição da raça/cor da cidade de São Paulo se distribui em 71% de cor branca, 23% de cor parda, 4% de cor preta, 1% de cor amarela, 0,2% de indígenas e 0,8% não

declararam sua cor. Na população de pacientes com EM era de se esperar menor quantidade de pardos/preto. A EM tem mostrado maior susceptibilidade para a etnia caucasiana e as diversas séries da literatura mostram essa tendência^{49,71,73,75}.

As grandes séries mundiais, em sua maioria européia, mostram uma predominância de pacientes caucasianos, maior que a nossa série. Nas séries nacionais, as casuísticas sofrem influências com a distribuição demográfica da região, com maiores índices de pacientes portadores de EM pardos/pretos no nordeste (93%⁸⁹ e 64%⁷⁶), média distribuição na região sudeste (33%⁹⁰, 26%⁹¹, 23%⁹²) e baixa distribuição na região sul (3%⁹³).

As formas clínicas dos pacientes portadores de EM se distribuíram em 68% na forma remitente recorrente; 12% com a forma secundariamente progressiva; 18% com forma primariamente progressiva e 2% de pacientes com a forma progressiva recorrente. Esta distribuição é próxima daquela que se observa nas séries de pacientes, descrita na literatura nacional^{91,92,94} e internacional^{49,71,73,75}, ao se selecionar um grupo representativo de pacientes com EM. Neste estudo houve leve menor porcentagem da forma secundariamente progressiva. Este fato se deve ao modo como os pacientes foram selecionados, em geral no momento do processo investigativo e consequentemente no início dos sintomas clínicos. Este processo seletivo foi fundamental na estratégia do protocolo investigativo, onde os pacientes ainda não haviam realizado o estudo do LCR ou que haviam, porém somente com estudos do dual citoproteico, tornando-se necessária nova investigação.

A caracterização do grupo controle de indivíduos sem doenças neurológicas e de pacientes com doenças inflamatórias do SNC se equiparou ao grupo de pacientes com EM com relação à idade, etnia e gênero. Auxiliou a maior proporção do sexo feminino em doenças inflamatórias do SNC o recrutamento de pacientes com vasculites do SNC, patologia mais constatada neste gênero¹⁸. Para uma proporção maior de indivíduos do sexo feminino nos indivíduos normais, procurou-se recrutar mais pacientes que realizavam procedimento cirúrgico ginecológico.

6.2 – A análise do LCR

Houve preocupação especial neste estudo, em relação aos critérios de qualidade da análise das amostras de LCR, obedecendo a recomendações expressas citadas no consenso de análise do LCR de Freedman MS, et al (2005)¹³. Segundo esses autores, deve haver garantia de que as amostras de LCR sejam processadas com padrão de excelência de qualidade. Isso inclui a utilização da tecnologia mais atualizada e aceita internacionalmente e a obediência aos critérios de reprodutibilidade que possa garantir a fidelidade dos resultados obtidos. A falha na implementação desses critérios de qualidade poderá levar a falsos resultados e, conseqüentemente, a erros diagnósticos.

Nosso estudo revelou que 54,4% dos pacientes com o diagnóstico de EM possuem presença de BOC. A sensibilidade foi de 100%, quando

comparados a pacientes sem doenças neurológicas, e de 82,1% quando comparados a pacientes portadores de doenças neurológicas inflamatórias. Esses resultados não confirmam aqueles obtidos em estudos brasileiros prévios, que apontaram frequências de 84%⁶⁸, 85%^{65,66} e 91%⁶⁷. Houve nesses estudos, importantes diferenças na metodologia que possivelmente influenciaram as interpretações. Em dois estudos foram examinados apenas pacientes com EM^{65,66}, e com isto não houve a valorização do grupo controle. Em todos os estudos não houve referência quanto à leitura cega das amostras. Este é um fundamento essencial, pois a leitura não é automatizada, e sim feita visualmente por um profissional experiente. O momento da leitura é um evento crucial que não deve sofrer qualquer forma de influência através de informações semiológicas, que podem influenciar os resultados. Estes estudos também não referem quanto à participação dos resultados das análises do LCR para a definição dos diagnósticos, e inclusão a posteriori dos pacientes na casuística da pesquisa.

Os resultados obtidos neste estudo podem ser interpretados sem nenhum viés eventualmente relacionado aos métodos diagnósticos utilizados. Os resultados das análises do LCR não eram conhecidos, e consequentemente não foram considerados para a inclusão de pacientes na casuística, evitando assim uma amostra viciosa. Os critérios de inclusão obedeceram rigorosamente às recomendações para o diagnóstico da EM, amplamente discutido em painel internacional de McDonald, revisado em 2005¹², que permitem estabelecer o diagnóstico sem o auxílio da análise do LCR. Neste estudo houve análise cuidadosa dos dados clínicos e de

imagem por pelo menos dois pesquisadores independentes, além do rastreamento de diagnósticos diferenciais^{17,18}.

No estudo do LCR, os dois pesquisadores que analisaram as amostras não conheciam o diagnóstico dos pacientes de quem provinham as amostras. A determinação de ocorrência de BOC foi feita isoladamente, sem que um pesquisador tivesse acesso à análise do outro, evitando, assim, qualquer viés na interpretação. Os resultados foram conhecidos por eles apenas após o término da pesquisa.

Muitos estudos da literatura internacional não seguem os cuidados metodológicos que este estudo procurou seguir. A maioria dos relatos resgata dados retrospectivos, de análise de prontuários^{14,42,45,47,49,51,60}. Nesta situação normalmente estão presentes dados semiológicos no momento da leitura das amostras de LCR, que podem influenciar os resultados. Nesta metodologia de pesquisa também os diagnósticos são suportados pelos resultados das análises do LCR, que também sofrem influências no recrutamento da casuística. A crítica neste sentido é que o estudo retrospectivo e a análise não cega das amostras levam a um aumento da frequência de BOC.

Quando estudos procuram seguir o rigor da análise cega das amostras^{20,43,44,46,48,81,84}, observa-se certa redução na frequências de BOC em pacientes com EM e altas frequências de BOC em outras patologias inflamatórias do SNC. No entanto esses estudos não utilizam esses pacientes como grupo controle, controlando com pacientes sem doenças inflamatórias, e com isso descrições de maior sensibilidade da pesquisa.

6.3 – As características demográficas

Este estudo mostrou que o grau de resposta humoral inflamatória é maior em indivíduos negros (pacientes que se autodeclararam de cor parda ou preta) do que em pacientes brancos com EM. A homogeneidade foi significativa na borda do nível de significância de 5% ($p = 0,0518$).

Diversos estudos descreveram diferenças entre negros e brancos, focados em aspectos clínicos da doença: prevalência, manifestações clínicas, curso evolutivo e incapacidade^{71,73,74,75,77}. Os dados descritos neste estudo mostram que diferenças étnicas na EM se estendem para a própria resposta imune, em particular para a resposta imune humoral, através da constatação da presença de BOC.

A associação do aumento da atividade humoral no LCR de negros adiciona um fenômeno imunológico mensurável para a lista de fatores já distinguíveis entre as diferentes etnias. As bases para esta diferença biológica ainda são desconhecidas, porém devem estar relacionadas a componentes genéticos. Embora a etnia seja aceita em nosso país como uma construção social que pobremente se associa com as diversidades genéticas, ainda pode ser possível que conjuntos de genes estejam distribuídos entre grupos étnicos, levando a diferentes suscetibilidades a determinadas doenças.

Um exemplo da importância que a imunogenética pode contribuir para um melhor entendimento da EM é a associação do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) Classe II, em particular o alelo DRB1*1501^{82,83,84}, com a maior susceptibilidade para a EM. Mesmo que os negros possuam maior diversidade de haplótipos que os brancos do norte europeu⁵, o alelo DRB1*1501 ainda emerge como um gene que leva a susceptibilidade para a EM entre os negros⁵. O MHC II apresenta antígenos para linfócitos T helper e atua na regulação de toda resposta imune específica, incluindo no componente humoral, que pode ser importante na patogênese da EM^{1,2,3,8}.

Igualmente este estudo mostrou que os gêneros também podem apresentar diferenças na resposta imune, não só cursando com maior susceptibilidade para o desenvolvimento da doença no sexo feminino, como uma maior resposta inflamatória quando o sexo masculino é acometido, medidos pela maior frequência de BOC (69,7% no sexo masculino e 49,3% no sexo feminino). A homogeneidade da presença de BOC nesta categoria foi pouco significativa na borda do nível de significância de 10% ($p=0,0915$).

A associação entre o resultado das BOC e a etnia dos pacientes, ajustados pelo gênero foi significativa na borda do nível de significância de 5% ($p=0,0518$). Os riscos relativos de apresentar BOC em brancos comparados com negros foram de 0,73 no grupo feminino e 0,59 no grupo masculino.

Não havendo ainda um conhecimento completo das bases destas constatações, se torna aceitável especular baseado em conhecimento intuitivo. É possível que um fator de proteção esteja presente no sexo masculino e nas diferentes etnias não caucasianas. Quando este fator não se apresenta, a resposta inflamatória da EM pode se mostra mais exuberante, cursando com maior incapacidade e mais rápida progressão^{71,73}, como também maior atividade inflamatória, medida pelo estudo das imunoglobulinas no LCR⁷².

A identificação de possíveis fatores de proteção, em determinados grupos populacionais, poderá esclarecer melhor os mecanismos da doença, além de contribuir para uma melhor estratégia terapêutica.

6.4 – O quadro clínico

O estudo do LCR esta usualmente centrado para a fase investigativa da doença, como ferramenta diagnóstica. Poucas descrições têm sido feitas quanto à relação da resposta imune humoral do LCR e as manifestações clínicas e evolutivas da doença. Estudos relatam que pacientes sem BOC possuem um curso clínico da doença mais benigno^{45,48,85}. Altos níveis de cadeias leves de kappa livre, um sub produto da síntese de anticorpos, tem mostrado ser preditor de uma rápida progressão de incapacidade, em curto ou médio prazo^{86,87,88}. Altos índices de IgM também têm sido relacionados a

altos índices de progressão da EM, que foram estimados pela progressão da incapacidade, medidos pela escala do EDSS^{39,40}.

A associação da atividade imune do LCR com uma maior agressividade da doença não é universal^{51,60}. Imrel K, et al (2006)⁸³ na Suécia descrevem que enquanto a presença de BOC no LCR se associa fortemente com a presença do alelo HLA-DRB1*15, as manifestações clínicas dos pacientes com BOC positivas ou negativas são indistinguíveis.

Com exceção da CIS, que tem mostrado menor frequência de BOC, existem poucos relatos na literatura quanto a diferentes formas clínicas da EM e a relação com a presença de BOC.

Este estudo mostrou uma forte significância em relação às formas clínicas da EM e a presença de BOC ($p=0,0103$) e ainda nas médias dos índices de IgG ($p=0,0081$). Quando se estudou em conjunto as formas progressivas e se relaciona estas formas com a forma remitente recorrente, também observamos maior presença de BOC ($p=0,0049$) e maiores médias dos índices de IgG ($p=0,0016$) nas formas progressivas da doença. Estes dados sugerem que a presença de imunoprodução intrathecal pode estar relacionada à fisiopatogenia das formas progressivas, e pode ser preditor de conversão para a fase progressiva em pacientes portadores da forma remitente recorrente. Mais estudos serão necessários para a elucidação dos distintos mecanismos fisiopatogênicos observados nas diferentes formas clínicas, o que poderá melhor nortear as estratégias terapêuticas.

Em nosso estudo, haviam BOC em 31,2% dos pacientes com CIS, frequência maior que aquela observada em outras doenças neurológicas inflamatórias. Esta proporção está de acordo com o que é descrito em outros trabalhos da literatura internacional^{14,30}. Esses dados mostram a importância do exame do LCR também em pacientes com as primeiras manifestações clínicas. A detecção de um perfil do LCR como o descrito, pode reforçar as evidências de que há um processo inflamatório no SNC, sobretudo em pacientes com dados clínicos e de imagem ainda não completamente delineados. Isso pode dar subsídios importantes para o diagnóstico, possibilitando o início precoce do tratamento.

6.5 – Considerações finais

O diagnóstico da EM esta fundamentado basicamente em critérios clínicos, o que até nos dias de hoje, diante dos grandes avanços tecnológicos, persiste soberano.

Testes paraclínicos são muito utilizados para suportar a semiologia clínica. Quando os critérios clínicos são exclusivamente aplicados no início da doença, um atraso no diagnóstico ocorre, pois um acompanhamento evolutivo é necessário. Desde o aparecimento de novas terapias modificadoras da história natural da doença, a procura por métodos que podem estabelecer um diagnóstico precoce tem sido objeto de grande interesse.

Diversos métodos foram descritos para a constatação da presença de BOC com diferentes graus de sensibilidade e especificidade, levando a variações de resultados nos diferentes estudos.

A FIE seguida do immunoblotting é a técnica mais sensível e apropriada para detectar BOC, indicada quando houver a suspeita da EM. Não obstante, de acordo com o College of American Pathologists Survey⁷⁸, considerando a quase totalidade dos 235 laboratórios dos EEUU que realizavam a análise do LCR, menos de 10% usavam esta técnica. Isto mostra claramente que, na prática, o método mais adequado para investigação de BOC é pouco utilizado, mesmo em países desenvolvidos. Um modo de contornar essa dificuldade é estimular o envio das amostras para laboratórios de referência, que possam garantir a qualidade do processamento do material.

A EM tem se mostrado enigmática em muitos aspectos da doença. Existe uma grande variabilidade dos sintomas e imprevisibilidade da evolução da incapacidade. Acrescenta-se ainda uma grande variação de prevalência da doença, com altos índices nos países de clima temperado. E por fim a diferença de susceptibilidade quanto ao gênero e a etnia.

Não obstante aos aspectos clínicos e demográficos, as provas laboratoriais também demonstram características dessa variabilidade. A literatura tem revelado grande variação quando a frequência de BOC no LCR de pacientes com EM nas diversas partes do mundo, fato este ainda sem completo esclarecimento.

Em alguns relatos referentes a países com alta frequência de BOC, principalmente em estudos que utilizaram metodologia de leitura cega, a especificidade do método mostrou-se relativamente baixa. De fato, é descrita a presença de BOC em doenças inflamatórias (com resultados variando de 21 a 70%^{7,8,18,46,48,79,81}), além de patologias não inflamatórias do SNC (com resultados de zero a 17%^{8,18,48,81}). Entretanto, outros estudos não concordam com a ocorrência desta baixa especificidade^{9,16}.

É interessante a avaliação da ocorrência de BOC feita em um estudo sueco. Callander M et al (2007)⁸⁴ pesquisaram um grupo de pessoas saudáveis, irmãs de portadores de EM. Foi observada a presença de BOC em 17,9% dessas pessoas saudáveis. Contrariando a hipótese mais provável, esses autores observaram que não houve relação entre o HLA de susceptibilidade desses indivíduos saudáveis e o de seus irmãos portadores de EM.

Deve ser contudo enfatizado, que os níveis de IgG no LCR possuem um relacionamento ainda não conhecido na patogênese da doença. Alguns autores argumentam que a elevação das imunoglobulinas pode representar um epifenômeno, não relacionado diretamente com os mecanismos da doença⁹⁵. Outros postulam que somente algumas imunoglobulinas, possivelmente específicas para a mielina ou outros antígenos do SNC, possam interferir nos mecanismos de formação das lesões^{96,97}. É ainda possível que o total de IgG encontradas no LCR, simplesmente não reflitam a proporção de resposta humoral associado com as agressões encontradas

no SNC^{95,96}. Não obstante alguns autores especulam que as imunoglobulinas possam exercer algum mecanismo protetor ou restaurador⁸.

A influência exercida pelo meio ambiente e a susceptibilidade genética das diferentes etnias podem determinar a ocorrência de expressivas variações de incidência da EM^{1,4,5,6}. Os resultados esperados quanto à frequência de BOC no Brasil não podem, portanto, serem estimados por simples extrapolação dos dados obtidos em países europeus ou da América do Norte.

O conhecimento da frequência de BOC da população-alvo que visamos assistir, conjuntamente com a utilização da melhor técnica de análise empregada, são fundamentos essenciais para a otimização da fase investigativa, possibilitando uma melhor estratégia terapêutica.

Muitas questões ainda persistem quanto à presença de BOC no LCR. Não há ainda definição clara quanto: 1) ao seu papel no mecanismo da doença; 2) à sua importância para o prognóstico; 3) às causas das variações de frequência em diferentes populações; 4) ao seu significado em patologias não inflamatórias do SNC. Essas são questões que ainda devem ser esclarecidas.

Certamente mais estudos precisam ser realizados em doentes com EM, com sistematização metodológica padronizada, eventualmente valorizando a identificação de subgrupos de pacientes com características próprias, inclusive no que diz respeito à resposta inflamatória do LCR.

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. A sensibilidade do método da focalização isoelétrica e imunoblotting para identificar BOC no LCR de pacientes com EM na cidade de São Paulo foi de 54,4%;
2. A especificidade deste método foi de 100% quando se utilizou o grupo controle de pacientes sem doenças neurológicas e 82,1% quando se utilizou o grupo controle de pacientes com doenças neurológicas inflamatórias.
3. As formas clínicas e a etnia dos pacientes com EM influenciam a frequência de BOC no LCR.

ANEXOS

1. A pesquisa estuda a esclerose múltipla, doença que afeta o cérebro e a medula, podendo deixar seqüelas definitivas como fraqueza, perda de

sensibilidade, incoordenação, perda de visão, urina e intestino preso ou solto, problemas de memória e atenção.

2. Iremos perguntar quando aconteceu a doença, como foi acontecendo os sintomas e como evoluiu. Para completar a pesquisa iremos usar os resultados colhidos dos exames de sangue e do líquido da espinha que normalmente já são colhidos para o seu tratamento. Esses exames foram indicados para o tratamento e não para a pesquisa. Não será solicitado nenhum exame a mais porque você entrou no estudo.
3. Este estudo não tem risco a mais para o seu corpo. Os riscos são aqueles que fazem parte do tratamento normal que esta sendo indicado pelo médico que esta fazendo o seu tratamento. Ao colher o líquido da espinha você vai sentir a picada da agulha e pode sentir dor de cabeça após. Para que a dor de cabeça não ocorra você terá que permanecer deitado por aproximadamente vinte minutos. Apesar de todos os cuidados a dor de cabeça poderá vir mesmo assim, e algumas vezes chegar a durar até uma semana. Também será colhido sangue que você sentira a dor da picada da agulha no braço. Algumas vezes pode ocorrer de escapar um pouco de sangue de baixo da pele e formar uma pequena mancha roxa (hematoma), que desaparece no máximo em sete dias.
4. O objetivo do estudo é o de descobrir quais são as alterações dos exames de sangue e do líquido da espinha nos pacientes com a esclerose múltipla na nossa região. Este estudo vai poder contribuir na maneira de determinação definitiva (diagnóstico) da esclerose múltipla pelos médicos e melhorar o entendimento da forma como manifesta a doença.
5. Os remédios que o seu médico receitou não serão mudados por causa desta pesquisa.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
 2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
 4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
-

**V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS
RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:**

Dr. Paulo Diniz da Gama – R. Conde Francisco Matarazzo 58 Vergueiro,
Sorocaba, SP - telefone 15 - 97890200

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter
entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo
de Pesquisa

São Paulo, ____/____/____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

ANEXO 2**GRUPO CONTROLE****HOSPITAL DAS CLÍNICAS**

FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Instruções para preenchimento no verso)

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE :.....
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F
 DATA NASCIMENTO:/...../.....
 ENDEREÇO Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE
 CEP:..... TELEFONE: DDD(.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
 NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 DOCUMENTO DE IDENTIDADE :..... SEXO: M F
 DATA NASCIMENTO.:/...../.....
 ENDEREÇO: Nº APTO:
 BAIRRO: CIDADE:
 CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: **Análise do líquido cefalorraquidiano com pesquisa de bandas oligoclonais na esclerose múltipla: valor diagnóstico e correlações clínicas na população sudeste do Brasil.**
2. PESQUISADOR: **Paulo Diniz da Gama**
 CARGO/FUNÇÃO: **Pós-graduando** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº: **70.477**
 UNIDADE DO HCFMUSP: **Neurologia**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
 SEM RISCO RISCO MÍNIMO **X** RISCO MÉDIO
 RISCO BAIXO RISCO MAIOR
 (probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)
4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 2 ANOS

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. A pesquisa estuda a esclerose múltipla, doença que afeta o cérebro e a medula, podendo deixar seqüelas definitivas como fraqueza, perda de sensibilidade, incoordenação, perda de visão, urina e intestino preso ou solto, problemas de memória e atenção.
 2. Para esta pesquisa iremos usar 3 ml do seu sangue e 3 ml do seu líquido da espinha que estão disponíveis devido aos procedimentos de anestesia raquidiana que é de rotina para o seu tratamento. Esse procedimento foi indicado para o seu tratamento, por seu médico e não para esta pesquisa. Não será solicitado nenhum procedimento a mais porque você entrou no estudo.
 3. Este estudo não tem risco a mais para o seu corpo. Os riscos são aqueles próprios relacionados à anestesia e ao procedimento cirúrgico indicado pelo seu médico. Ao colher o líquido da espinha você vai sentir a picada da agulha e pode sentir dor de cabeça após. Também será colhido sangue que você sentira a dor da picada da agulha no braço. Algumas vezes pode ocorrer de escapar um pouco de sangue de baixo da pele e formar uma pequena mancha roxa (hematoma), que desaparece no máximo em sete dias.
 4. O objetivo do estudo é o de descobrir quais são as alterações dos exames de sangue e do líquido da espinha nos pacientes com a esclerose múltipla e de pessoas sem a esclerose múltipla na nossa região. Este estudo vai poder contribuir no modo de determinação definitiva (diagnóstico) da esclerose múltipla pelos médicos e melhorar o entendimento da forma como manifesta a doença.
 5. Os remédios que o seu médico receitou não serão mudados por causa desta pesquisa.
-

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
 2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
 3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
 4. Disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.
-

**V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS
RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:**

Dr. Paulo Diniz da Gama – R. Conde Francisco Matarazzo 58 Vergueiro,
Sorocaba, SP - telefone 15 - 97890200

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter
entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo
de Pesquisa

São Paulo, ____/____/____

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(*carimbo ou nome legível*)

ANEXO 3

PROTOCOLO CLÍNICOGrupo de Pacientes Portadores de Esclerose Múltipla

- Nome do paciente: _____
- Naturalidade _____ Procedência _____
- Idade _____ Data de Nascimento ____ / ____ / ____
- Sexo _____ Cor: branca [] preta [] parda [] amarela [] indígena []
- Idade ao início (primeiro sintoma): _____
- Subgrupo: a) paciente visto desde o início do diagnóstico []
b) paciente não visto desde o início do diagnóstico []
- Idade à última visita fora do surto: _____
- Modo de início a) monossintomático []
b) polissintomático []
- Sintomas iniciais: motor [] sensitivo [] cerebelar [] tronco [] esfíncter []
Neurite óptica [] sintoma de Lhermitte []
- Sintomas no curso da doença: motor [] sensitivo [] cerebelar [] tronco []
esfíncter [] neurite óptica [] sintoma de Lhermitte [] cognitivo [] fadiga []
depressão [] psicose [] intolerância ao calor [] dor [] crises
espásticas [] sintoma de Uhthoff []
sintomas paroxísticos [] quais? _____
- Forma Evolutiva da esclerose múltipla: recorrente-remitente []
secundariamente progressiva [] primariamente progressiva [] progressiva
recorrente []
- Duração da doença (intervalo entre idade ao início e idade ao último exame):
- Tempo de conversão entre as formas RR e SP: _____
- Intervalo entre o 1º e o 2º surtos (meses): _____
- Numero de surtos: Durante o primeiro ano _____
Durante os três primeiros anos _____ Durante os cinco primeiros anos _____
- EDSS ao último exame fora do surto: _____

- Intervalo entre o primeiro sintoma e o grau de incapacidade (anos):

- a. EDSS 4 (discreta limitação para andar): _____
- b. EDSS 6 (uso de apoio para andar): _____
- c. EDSS 7 (cadeira de rodas): _____
- d. EDSS 8 (restrito ao leito): _____

Tratamento profilático: sim [] não [] ano de início: _____

Qual: Imunomodulador: Rebif [] Avonex [] Betaferon [] Copaxone []
Imunossupressor: Corticosteróides [] Azatioprina []
Metotrexate [] Mitoxantrone [] Imunoglobulina []

Formas Familiares: sim [] não []

- a. irmãos [] b. pais [] c. filhos [] d. primos de 1º grau []
- e. tios/sobrinhos []

ANEXO 4

PROTOCOLO CLÍNICO

Grupo de Pacientes Portadores de Doenças Neurológicas Inflamatórias

- Pesquisador: _____ Nº do caso _____

- Nome do paciente: _____

- Naturalidade _____ Procedência _____

- Idade _____ Data de Nascimento ____ / ____ / ____

- Sexo _____

- Cor: branca [] preta [] parda [] amarela [] indígena []

- Provas Laboratoriais:

- Diagnóstico:

ANEXO 5

PROTOCOLO CLÍNICO

Grupo de Pacientes Controle com Ausência de Sintomas Neurológicos

- Pesquisador: _____ Nº do caso _____

- Nome do paciente: _____

- Naturalidade _____ Procedência _____

- Idade _____ Data de Nascimento ____ / ____ / ____

- Sexo _____

- Cor: branca [] preta [] parda [] amarela [] indígena []

- Motivo do procedimento cirúrgico _____

ANEXO 6

TERMO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 14.09.05, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 800/05, intitulado: "Análise do líquido com pesquisa de bandas oligoclonais na esclerose múltipla: valor diagnóstico, correlações clínicas e análise imunogenética na população sudoeste do Brasil" apresentado pelo Departamento de NEUROLOGIA, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX. 2, letra "c")

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Luis dos Ramos Machado**

Pesquisador (a) Executante: **Dr. Paulo Diniz da Gama**

CAPPesq, 14 de Setembro de 2005.

PROF. DR. CLAUDIO LEONE

Vice-Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

ANEXO 7

**TERMO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA
PARA O GRUPO CONTROLE** **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11/10/06, **APROVOU** o Novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido referente ao Protocolo de Pesquisa nº 800/05, intitulado: "Análise do líquido com pesquisa de bandas oligoclonais na esclerose múltipla: valor diagnóstico, correlações clínicas e análise imunogenética na população sudoeste do Brasil" apresentado pelo Departamento de NEUROLOGIA.

Pesquisador(a) Responsável: DR. LUIS DOS RAMOS MACHADO

Pesquisador (a) Executante: DR. PAULO DINIZ DA GAMA

CAPPesq, 11 de Outubro de 2006.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

ANEXO 8

Dados demográficos, formas clínicas e respectivos resultados das análises quantitativa e qualitativa do LCR dos pacientes portadores de EM.

Nome	gênero	cor	Formas clínicas	índice IgG	BOC FIE
AT	F	B	EM PP	2,00	+
AAS1	F	B	EM RR	0,50	-
AAS2	F	N	EM PP	3,30	+
ABR	F	B	EM RR	1,20	+
ACO	F	N	EM PP	0,76	+
APE	F	B	EM PR	1,20	+
ARSS	F	N	EM RR	0,50	-
AS	M	B	EM PP	2,80	+
ASB	F	B	EM RR	0,40	-
BAA	F	B	EM RR	0,50	-
CJCAS	F	N	EM RR	1,00	-
CBM	M	B	EM RR	0,40	-
CS	F	N	EM SP	1,10	+
CGMS	F	N	EM RR	0,70	+
CF	F	B	EM SP	2,50	+
CAA	F	N	EM RR	1,10	-
DDB	F	B	EM RR	0,60	-
DMS	F	N	EM SP	0,60	-
DFC	M	B	EM RR	2,18	+
ECD	M	N	EM PP	0,90	+
EM	M	B	EM PP	1,00	+
EC	M	B	EM SP	0,80	+
ELB	F	B	EM PP	0,40	-
ESP	F	N	EM SP	0,60	-
EVS	M	N	EM RR	0,40	+
EPF	M	B	EM RR	1,10	+
ECC	F	B	EM RR	0,60	-
EPA	F	B	EM RR	0,60	-
EMFS	F	B	EM RR	0,80	+
FPAG	F	B	EM RR	0,60	+
FLS	F	B	EM RR	0,60	-
FRC	F	B	EM RR	0,80	-
GRS	M	B	EM RR	2,14	+
GCM	F	B	EM RR	1,00	+
JAC	F	B	EM RR	0,60	-
KS	M	B	EM RR	1,40	+
LAFA	F	B	EM SP	0,60	-
LPP	F	B	EM RR	1,14	-
LHM	M	B	EM RR	1,30	-
LDM	F	N	EM RR	1,59	+
LLVN	F	B	EM RR	1,40	-
LNA	F	B	EM RR	0,60	-
LAC	F	B	EM RR	0,90	+
MPV	F	N	EM RR	1,07	+
MYS	F	A	EM RR	0,60	+
MAAS	M	N	EM PP	0,90	+

Continua

Continuação

Nome	gênero	cor	Formas clínicas	índice IgG	BOC FIE
MAMM	F	B	EM RR	0,45	-
MAS	F	B	EM RR	0,60	-
MCS	F	B	EM SP	0,80	-
MFRL	F	B	EM RR	0,60	-
MLFC	F	B	EM RR	0,51	-
MHLN	F	N	EM RR	1,09	+
MHRM	F	B	EM RR	0,64	+
MSRB	F	B	EM SP	0,70	+
MAR	F	B	EM RR	0,60	-
MA	F	B	EM RR	0,70	-
MMOS	F	B	EM RR	0,33	-
MLS	F	B	EM PP	1,29	+
NMGF	F	N	EM RR	1,15	+
ONPS	F	B	EM RR	0,50	-
PCJ	F	B	EM RR	2,80	+
OS	F	B	EM RR	0,50	+
PCM	M	B	EM PP	0,97	+
PAG	M	B	EM RR	0,70	-
PCG	F	N	EM RR	0,50	-
RF	M	B	EM RR	0,60	+
RVJ	M	B	EM RR	0,50	-
RB	F	B	EM PP	1,90	+
RPS	F	B	EM PP	1,60	+
RFM	F	B	EM RR	0,47	-
RB	M	N	EM PP	1,60	+
RLL	M	B	EM RR	0,68	+
RAM	M	B	EM RR	0,60	-
RS	M	N	EM RR	0,60	+
RBS	M	N	EM RR	0,89	+
RF	M	B	EM PP	0,80	-
RAO	F	N	EM RR	1,40	+
RMPGT	F	B	EM RR	1,00	-
RM	F	B	EM SP	1,60	+
SAS1	F	B	EM RR	0,80	+
SAS 2	M	B	EM RR	0,60	-
SBFV	F	B	EM PR	1,80	+
SRSC	F	B	EM RR	0,47	-
STT	F	B	EM RR	0,60	-
VSA	F	B	EM PP	1,38	+
VFA	F	N	EM SP	0,80	-
VM	F	B	EM RR	0,70	+
VBS	F	B	EM SP	2,30	+
WJT	M	B	EM PP	1,90	+
YCSA	F	N	EM RR	3,60	+

Legendas: LCR (líquido cefalorraquidiano); EM (esclerose múltipla); IgG (imunoglobulina); BOC (bandas oligoclonais); FIE (focalização isoeétrica); M (masculino); F (feminino); B (autodeclarado de cor branca); N (negro, autodeclarado de cor parda/preta); A (autodeclarado de cor amarela); EMRR (esclerose múltipla remitente recorrente); EMSP (esclerose múltipla secundariamente progressiva); EMPP (esclerose múltipla primariamente progressiva); EMPR (esclerose múltipla progressiva recorrente)

Dados demográficos, formas clínicas e respectivos resultados das análises quantitativa e qualitativa do LCR dos pacientes portadores de CIS, DISNC e grupo controle.

nome	gênero	cor	diagnóstico	índice IgG	BOC LCR
AAF	M	B	CIS	0,98	+
ACRS	F	N	CIS	1,40	+
APMA	F	B	CIS	1,43	-
CI	F	B	CIS	0,58	+
EVS	F	B	CIS	0,50	-
ESF	F	B	CIS	1,23	+
ERS	M	B	CIS	0,44	-
ESA	M	B	CIS	1,06	-
GSHS	F	B	CIS	1,17	+
JPR	M	B	CIS	0,53	-
KA	F	N	CIS	0,73	-
MMQ	F	B	CIS	0,57	-
RC	F	B	CIS	0,46	-
SEM	F	B	CIS	0,44	-
VLAC	F	N	CIS	0,59	-
TRR	F	B	CIS	0,54	-
DSM	M	N	controle	0,63	-
DNA	F	B	controle	0,52	-
FO	F	N	controle	0,50	-
HP	F	B	controle	0,41	-
ICF	F	B	controle	0,88	-
JFS	M	N	controle	0,54	-
JPB	M	B	controle	0,57	-
LC	F	B	controle	0,39	-
MAS	F	N	controle	0,65	-
MCV	F	B	controle	0,39	-
MCH	F	B	controle	0,43	-
MG	F	B	controle	0,41	-
MC	F	B	controle	0,48	-
NRS	F	N	controle	0,45	-
PFS	M	B	controle	0,54	-
PAO	M	N	controle	0,62	-
RATA	M	B	controle	0,51	-
RFS	M	N	controle	0,45	-
WSS	F	B	controle	0,56	-

Continua

Continuação

nome	gênero	cor	diagnóstico	índice IgG	BOC LCR
ATP	M	B	vasculite	0,52	+
CCS	F	N	vasculite	0,38	-
CMN	F	B	vasculite	0,88	-
DPD	F	B	vasculite	0,54	-
FTS	F	B	vasculite	0,53	-
LAB	M	N	vasculite	0,37	-
LM	F	B	vasculite	0,19	+
LYOT	F	A	vasculite	0,56	-
MPF	F	B	vasculite	0,43	-
MOB	F	B	vasculite	1,35	-
RCO	F	N	vasculite	0,46	-
SGS	F	B	vasculite	0,52	+
SMP	F	B	vasculite	0,67	-
VLTS	F	B	vasculite	0,50	-
WGAS	M	B	vasculite	0,52	-
ASM	M	B	mielop Infl	0,48	-
CS	F	B	Devic	0,62	-
CFS	F	B	ADEM rec	0,47	-
DMS	F	N	NO rec	0,50	+
FAS	F	B	NO rec	1,58	+
FSCO	F	N	Devic	0,70	-
FFF	M	B	Devic	0,63	-
JRS	M	N	ADEM rec	0,63	-
KN	M	A	ADEM	0,33	-
MAMF	F	N	Devic	0,78	-
MMQ	F	N	mielop Infl	0,57	-
MGGB	F	N	Devic	0,54	-
MJN	M	B	mielop infl	1,99	-
RS	F	B	Devic	0,44	-
SAS	F	N	mielop infl	1,83	-
AC	M	B	hepatite C	2,01	-
CRS	M	N	hepatite B	0,46	-
EARSJ	M	B	hepatite C	0,77	-
EMA	M	B	esquistos	0,86	-
FF	M	B	sífilis	1,24	-
GS	F	B	HTLV	0,78	+
JLA	F	N	esquistos	0,74	+
LRVS	F	N	NO viral	0,46	-
MMV	M	N	HTLV	0,58	-

Legendas: LCR (líquido cefalorraquidiano); CIS (síndrome clínica isolada); DISNC (doenças inflamatórias do sistema nervoso centra); IgG (imunoglobulina); BOC (bandas oligoclonais); FIE (focalização isoeletrica); M (masculino); F (feminino); B (autodeclarado de cor branca); N (negro, autodeclarado de cor parda/preta); A (autodeclarado de cor amarela)

ANEXO 9

Relatório estatístico do estudo do líquido cefalorraquidiano para o diagnóstico da esclerose múltipla

Análise estatística: Cicília Yuko Wada

Metodologia estatística:

1- Estatística descritiva:

- Frequências e porcentagens para tabelas de contingências de BOC vs gênero, BOC vs cor e BOC vs formas clínicas;
- Frequências e porcentagens para tabelas de classificação cruzada de cor x gênero x BOC, cor x formas clínicas x BOC e gênero x formas clínicas x BOC;
- estatísticas sumárias do índice de IgG vs BOC por cor, gênero e formas clínicas.

2- Inferência estatística:

2.1: Testes de homogeneidade de BOC vs cor, BOC vs gênero, BOC vs formas clínicas:

- A estatística do teste de homogeneidade é o χ^2 Pearson, com graus de liberdade (g.l.)
- A rejeição da hipótese H_0 é verificada quando P-valor (P) do teste for menor que o nível de significância de 5%.

2.2: Testes de associação nas tabelas de classificação cruzada:

- Utilizado o teste estatístico de Cochran-Mantel e Haenzel (CMH). As variáveis estudadas forão: cor vs BOC ajustado por gênero, gênero vs BOC ajustado por cor, formas clínicas vs BOC ajustado por gênero, formas clínicas vs BOC ajustado por cor e BOC.
- A estatística do teste CMH é o χ^2 , com 1 grau de liberdade.

2.3: Riscos Relativos (R):

- Uma medida de associação (quando a associação for significativa) que é utilizada em tabelas de classificação cruzada é o Risco relativo (R)

calculado em cada estrato e no caso de homogeneidade entre os riscos, o Risco Relativo Comum (r) é calculado.

- A rejeição da hipótese H_0 é verificada quando o Risco relativo $R=1$ estiver fora do Intervalo.

2.4: Testes de comparação de médias de IgG , segundo cor, gênero, formas clínicas e BOC:

– O teste estatístico para comparação de medias de IgG segundo níveis de cor, gênero e formas clínicas (com dois níveis RR e Outros) é realizado utilizando teste t de Student (t).

2.5: Testes de comparação de médias de IgG segundo formas clínicas com 4 níveis :

– O teste estatístico para comparação de medias de IgG segundo níveis de formas clínicas (com quatro níveis) é realizado utilizando teste F de Snedecor (F).

Resultados:

1- BOC – gênero, cor e formas clínicas

Tabela 1: Gênero vs BOC

Gênero	freq. %	BOC		Total
		Positiva	Negativa	
Feminino	freq. %	33 49,25	34 50,75	67
Masculino	freq. %	16 69,57	7 30,43	23
Total	freq. %	49 54,44	41 45,56	90

Teste de homogeneidade: $X^2=2,85$; g.l.=1; $p=0,0915$

- Homogeneidade de BOC positivo por categorias de gênero (Tabela 1) foi não significativa ao nível de significância de 5% ($P= 0,0915$).

Tabela 2: Cor vs BOC

Cor	freq. %	BOC		Total
		Positiva	Negativa	
Branca	freq. %	32 48,48	34 51,52	66
Nao branca	freq. %	17 70,83	7 29,17	24
Total	freq. %	49 54,44	41 45,56	90

Teste de homogeneidade: $X^2=3,54$; g.l.=1; $p=0,0518$

Risco Relativo $R=0,69$; IC(95%): (0,48;0,98)

- Homogeneidade de BOC positivo por categorias de cor (Tabela 2) foi significativa na borda do nível de significância de 5% ($P=0,0518$). As proporções (p) de BOC positivo em pacientes de Cor Branca e Não-Branca forma: $p=48,48\%$ e $p=70,83\%$, respectivamente. O risco de BOC positivo em pacientes de cor Branca relativo a pacientes de cor Não-branca foi de 0,69; o intervalo de confiança de 95% de R foi de (0,48;0,98) que não contem $R=1$, indicando que as porcentagens de BOC positivo em pacientes de cor Branca e Não-Branca não são iguais , ao nível de confiança de 5%.

Tabela 3: formas clínicas vs BOC

formas clínicas	freq. %	BOC		
		Positiva	Negativa	Total
PP	freq. %	14 87,5	2 12,5	16
PR	freq. %	2 100	0 0	2
RR	freq. %	27 44,26	34 55,74	61
SP	freq. %	6 54,55	5 45,45	11
Total	freq. %	49 54,44	41 45,56	90

Teste de homogeneidade: $X^2=11,27$; g.l.=3; $p=0,0103$

Tabela 3 A: formas clínicas vs BOC

formas clínicas	freq. %	BOC		
		Positiva	Negativa	Total
RR	freq. %	27 44,26	34 55,74	61
Outros	freq. %	22 75,86	7 24,14	29
Total	freq. %	49 54,44	41 45,56	90

Teste de homogeneidade: $X^2=7,913$; g.l.=1; $p=0,0049$

Risco Relativo $R=0,58$; IC(95%): (0,41;0,83)

- Homogeneidade de BOC positivo por categorias de formas clínicas (Tabela 3) foi significativa ($P=0,0103$), ao nível de significância de 5%. As porcentagens (p) de BOC positivo das formas clínicas foram: PP: $p=97,5\%$, PR: $p=100\%$, RR: $p=44,26\%$ e SP: $p=54,55\%$. Com as formas clínicas considerando dois níveis (Tabela 3 A), RR e Outros (PP+PR+SP), a homogeneidade de BOC positivo entre as categorias de formas clínicas continuou significativa ($P=0,0049$), ao nível de significância de 5%; as proporções (p) de BOC positivo das formas clínicas foram: RR: $p=44,26\%$ e Outros: $p=75,86\%$. O risco de BOC positivo em pacientes com forma clínica RR relativo a pacientes com outras formas clínicas foi de 0,83; o intervalo de

confiança de 95% de R foi de (0,41;0,83) que não contem R=1, indicando que as porcentagens de BOC positivo em pacientes com forma clínicas RR e outras formas clínicas, não são iguais, ao nível de confiança de 5%.

2: BOC vs gênero vs cor vs formas clínicas - análises de tabelas estratificadas

Tabela 4: Cor vs BOC controlando por gênero

Gênero	Cor	freq. %	BOC			Risco Relativo (R)
			Positiva	Negativa	Total	
Feminino	Branca	freq. %	22 44.90	27 55.10	49	0,73
	Nao-branca	freq. %	10 58.82	7 41.18	17	
	Total	freq.	33	34	67	
Masculino	Branca	freq. %	10 58.82	7 41.18	17	0,59
	Nao-branca	freq. %	6 100.00	0 0.00	6	
	Total	freq.	16	7	23	

Teste de não associacao (C-MH) : $X^2 = 3,63$; g.l.=1; p=0,0568
R comum=0,68; IC(95%)=(0,48;0,97)

- Associação entre BOC e Cor ajustado por Gênero (Tabela 4) foi significativa na borda do nível de significância de 5% ($P=0,0568$). Os riscos relativos de BOC positivo em brancos comparados com não-brancos foram de 0,73 no grupo feminino e 0,59 no grupo masculino. Desde que os Riscos Relativos dos estratos Feminino e Masculino foram homogêneos, o Risco comum de BOC positivo em brancos relativo a não brancos foi de 0,68, isto é, o risco de não brancos ter BOC positivo é 47% maior que o de brancos, e o IC(95%): (0,48;0,97) indica que o Risco Relativo 1 não está contido no IC(95%), o que indica que a hipótese de Risco relativo populacional igual a 1 é rejeitada, ao nível de significância de 5%.

Tabela 5: formas clínicas vs BOC controlando por gênero

Genero	f. clínicas	freq. %	BOC			RR
			Positiva	Negativa	Total	
Feminino	RR	freq. %	18 39,13	28 60,87	46	0,55
	Outras	freq. %	15 71,43	6 28,57	21	
	Total	freq.	33	34	67	
Masculino	RR	freq. %	9 60,00	6 40,00	15	0,69
	Outras	freq. %	7 87,5	1 12,5	8	
	Total	freq.	16	7	23	

Teste de não-associacao: $X^2 = 7,70$; g.l.=1; p=0,0055
R comum=0,59; IC(95%)=(0,42;0,83)

- Associação entre BOC e formas clínicas ajustado por gênero (Tabela 6) foi significativa ($P=0,0055$), ao nível de significância de 5%. Os riscos relativos de BOC positivo no grupo de formas clínicas RR comparados com os do grupo de outras formas clínicas foram de 0,55 no grupo Feminino e 0,69 no grupo Masculino; o Risco relativo comum entre forma clínica RR e outras foi de $r=0,59$, isto é o risco de ter BOC positivo em pacientes com outras formas clínicas é 80% maior dos que tem forma clínicas RR. O IC(95%) não contem $R=1$, o que indica que a hipótese de igualdade entre os riscos de BOC positivo em pacientes com forma clínicas RR e outras formas clínicas não são iguais.

Tabela 6: formas clínicas vs BOC controlando por cor

Cor	F. clínicas	freq. %	BOC			Risco Relativo
			Positiva	Negativa	Total	
Branca	RR	freq. %	16 34,78	30 65,22	46	0,43
	Outras	freq. %	16 80	4 20	20	
Não branca	Total RR	freq. freq.	32 11	34 4	66 9	1,1
	Outras	freq. %	6 66,67	3 33,33	6	
	Total	freq.	17	7	24	

Teste de não-associacao: $X^2=7,40$; g.l.=1; $p=0,0065$

- Associação entre BOC e formas clínicas ajustado por cor (Tabela 7) foi significativa ($P=0,0065$), ao nível de significancia de 5%. A homogeneidade dos riscos entre os estratos não é verificada.

3- IgG –gênero, cor e formas clínicas

Tabela 7: Estatísticas sumárias de IgG segundo formas clínicas

Formas clínicas	n	Média	Desvio padrao	Erro padrao	Minimo	Mediana	Maximo	CV
PP	16	1,47	0,78	0,19	0,40	1,34	3,30	52,92
PR	2	1,50	0,42	0,30	1,20	1,50	1,80	28,28
RR	61	0,88	0,58	0,07	0,34	0,60	3,60	66,59
SP	11	1,13	0,69	0,21	0,60	0,80	2,50	61,60
Total	90	1,03	0,67	0,07	0,34	0,80	3,60	64,96

Comparação de médias:

PP=PS=RR=SP ; $F=4,19$; g.l.=3; $P=0,0081$

PP vs SP: $t=1,38$; $P=0,17$; diferença=0,34; erro-padrao=0,25

PR vs RR: $t=1,37$; $P=0,17$; diferença=0,62; erro padrão=0,46

Tabela 8: Estatísticas sumárias de IgG segundo formas clínicas

F. clínicas	n	Média	Desvio padrão	Erro padrao	Mínimo	Mediana	Máximo	CV
RR	61	0,88	0,58	0,07	0,34	0,60	3,6	66,59
Outros	29	1,34	0,73	0,14	0,40	1,10	3,3	54,34
Total	90	1,03	0,67	0,07	0,34	0,80	3,60	64,96

Comparação de médias: $t=3,25$; $P=0,0016$; diferença=0,46; erro padrão=0,14; IC(95%): (0,18;0,75).

• As diferenças entre as médias de IgG (Tabela 10) foram significantes nos níveis de formas clínicas ($P=0,0081$); as médias e os erros padrões de IgG nos níveis das formas clínicas foram: PP: $1,47 \pm 0,19$, PR: $1,50 \pm 0,30$, RR: $0,88 \pm 0,07$ e SP: $1,13 \pm 0,21$. Com formas clínicas em dois níveis (Tabela 10 A), a estimativa da diferença entre as médias de IgG de pacientes com formas clínicas foi de 0,46 com erro padrão de 0,14. O intervalo de confiança de 95% das diferenças de médias populacionais não contém o valor zero, o que indica a rejeição da hipótese de igualdade das médias de IgG de pacientes com forma clínica RR e outras. Isto significa que as medias de IgG diferem de modo significativo em pacientes com forma clínica RR e outras, sendo maior em outras (média $\pm$ erro padrão) : RR ($0,88 \pm 0,07$) e Outras ($1,34 \pm 0,14$).

4: IgG – BOC e formas clínicas

Tabela 9: Estatísticas sumárias de IgG segundo BOC

BOC	n	Média	Desvio padrão	Erro padrao	Mínimo	Mediana	Máximo	CV
positivo	49	1,34	0,75	0,11	0,40	1,10	3,60	56,17
negativo	41	0,66	0,24	0,04	0,34	0,60	1,40	36,84

Comparação de medias: $t=5,54$; $P<0,0001$; diferença=0,68; erro padrão=0,12; IC(95%): (0,43;0,92).

• A diferença entre as médias de IgG nos níveis de BOC (Tabela 11) resultou significativa ($P<0,0001$); as médias e os erros padrões de IgG nos níveis de BOC foram: BOC positivo: $1,34 \pm 0,11$ e BOC negativo: $0,66 \pm 0,04$, portanto média de IgG maior com BOC positivo. A estimativa da diferença entre as médias de IgG de pacientes com BOC positivo e negativo foi de 0,68 com erro padrão de 0,12. O intervalo de confiança de 95% das diferenças de médias populacionais não contém o valor zero, o que indica as médias de IgG em pacientes com BOC positivo dos negativos não são iguais, com uma confiança de 95%.

Tabela 10: Estatísticas sumárias de IgG segundo formas clínicas e BOC

F clínicas	BOC	n	Média	Desvio padrão	Erro padrao	Mínimo	Mediana	Maximo	CV
Outros	Positivo	22	1,56	0,70	0,15	0,70	1,49	3,30	45,18
	Negativo	7	0,66	0,15	0,06	0,40	0,60	0,80	23,01
RR	Positivo	27	1,15	0,75	0,14	0,40	0,90	3,60	64,95
	Negativo	34	0,66	0,26	0,04	0,34	0,60	1,40	39,35

RR vs Outros: $t=2,05$; $p=0,0435$; diferença=0,27; erro padrão=0,13

Positivo vs Negativo: $t=4,78$; $P<0,0001$; diferença=0,60; erro padrão=0,13

- A análise de variância de IgG, segundo formas clínicas e BOC (Tabela 12), resultou em:
 - efeitos significantes de forma clínica ($p=0,0435$) e BOC ($p<0,0001$), isto é, as diferenças entre a forma clínica RR e outras e entre BOC positivos e negativos foram significantes;
 - as médias e erros padrões de BOC positivo em pacientes com forma clínica RR foi de $1,15 \pm 0,14$ e em pacientes com outras formas clínicas foi de $1,56 \pm 0,15$.

5: IgG_C vs BOC vs formas clínicas

Tabela 11: formas clínicas vs BOC vs IgG_C

Forma clínica	BOC	freq. %	IgG		
			$\geq 0,80$	$< 0,80$	Total
RR	Positivo	freq.	17	10	27
		%	62,96	37,04	
	Negativo	freq.	7	27	34
		%	20,59	79,41	
Outros	Positivo	freq.	20	2	22
		%	90,91	9,09	
	Negativo	freq.	3	4	7
		%	42,86	57,14	

Teste de associação: $\chi^2=17,51$; g.l.=1; $p<0,0001$

Risco relativo comum=2,66; IC(95%): (1,53;4,63)

- Associação entre BOC e IgG_C ajustado por formas clínicas (Tabela 18) foi significativa ($P<0,0001$), ao nível de significância de 5%. Os riscos de IgG $\geq 0,80$ de pacientes com BOC positivo relativo a pacientes com BOC negativo no grupo da forma clínica RR e no grupo de outras formas clínicas foram de 3,07 e 2,12, respectivamente; o risco relativo comum foi de $r=2,66$, isto é o risco de ter IgG $\geq 0,80$ em pacientes com BOC positivo sobre pacientes foi 2 vezes maior do que em pacientes com BOC negativo. O IC(95%) não contém $R=1$, o que indica que a hipótese de igualdade entre os riscos de IgG $\geq 0,80$ em pacientes com BOC positivo e BOC negativo não são iguais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

1. Poser CM, McDonald WI. An Atlas of multiple sclerosis. New York: The Parthenon Publishing Group; 1998.
2. Reiber H. Cerebrospinal fluid – physiology, analysis and interpretation of protein patterns for diagnosis of neurological diseases. *Mult Scler* 1998;4:99-107.
3. Link H, Huang Y-M. Oligoclonal band in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness. *J Neuroimmunol* 2006;180:17-28.
4. Baranzini SE, Oksenberg JR. Role of genomics in studying MS. *Int JS J* 2001; 9(3): 91-99.
5. Brassat D, Motsinger AA, Caillier SJ, Erlich HA, Walker K Steiner LL, et al. Multifactor dimensionality reduction reveals gene-gene interactions associated with multiple sclerosis susceptibility in African Americans. *Genes Immun* 2006; 7: 310-315.
6. Fukazawa T, Kikuchi S, Sasaki H, Hamada K, Hamada T, Miyasaka K, Tashiro K. The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis in Japan: relevance of immunogenetic backgrounds. *J Neurolo Sci* 1998; 158(2): 209-214.

¹ De Acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações e teses. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena, São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *Listo f Jornal Indexed in Index Medicus*.

7. Christensen T. Human Herpesviruses in MS. *Int MS J* 2007; 14: 41-47.
8. Correale J. Oligoclonal bands and antibody responses in multiple sclerosis. *J Neurol* 2002;249:375-389.
9. Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM. Axonal transaction in the lesion of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-285.
10. Perry VH, Anthony DC. Axon damage and repair in multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999; 354: 1641-1647.
11. Zettl UK, Tumani H. Multiple sclerosis & cerebrospinal fluid. Navarra: Blackwell Publishing Ltd; 2005.
12. Polman D, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58: 840-846.
13. Freedman MS, Thompson EJ, Deisenhammer F, Giovannoni G, Grimsley G, Keir G, et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis – a consensus statement. *Arch Neurol* 2005;62:865-870.
14. Rot U, Ledinek AH, Jazbec SS. Clinical, magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid and electrophysiological characteristics of the earliest multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2008; 110(3): 233-238.
15. Korteweg T, Tintoré M, Uitdehaag B, Rovira A, Frederiksen J, Miller David, et al. MRI criteria for dissemination in space in patients with clinically isolated syndromes: a multicentre follow-up study. *Lancet Neurol* 2006; 5: 221-227.
16. Drulovic J, Stojasavjevic N, Dujmovic I, Sokic D, Mavra M, Levic Z. Findings of cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis. *Srp Arh Clok Lek* 1995; 123(7-8): 191-193.

17. Miller DH, Weinshenker BG, Filippi M, Banwell BL, Cohen JA, Freedman MS, et al. Differential diagnosis of suspected multiple sclerosis: a consensus approach. *Mult Escl* 2008; 14: 1157-1174.
18. Reske D, Petereit H-F, Heis W-D. Difficulties in the differentiation of chronic inflammatory diseases of the central nervous system – value of cerebrospinal fluid analysis and immunological abnormalities in the diagnosis. *Acta Neurol Scand* 2005; 112: 207-213.
19. Lunding J, Midgard R, Vedeler CA. Oligoclonal bands in cerebrospinal fluid: a comparative study of isoelectric focusing, agarose gel electrophoresis and IgG index. *Acta Neurol Scand* 2000; 102:322-325.
20. Falip M, Tintoré M, Jardi R, Duran I, Link H, Montalbán S. Utilida clínica de las bandas oligoclonales. *Ver Neurol* 2001;32(12):1120-1124.
21. Lau KK, Wong LKS, Li LSW, Chan YW, Li HL, Wong V. Epidemiological study of multiple sclerosis in Hong Kong Chinese: questionnaire survey. *HKMJ* 2002;8:77-80.
22. Gomes MM. Marcos históricos da neurologia. Rio de Janeiro: Editora Científica Nacional; 1997.
23. Reis JB, Bei A, Reis-Filho JB, Nasser Jayme. Líquido cefalorraquiano. São Paulo: Sarvier; 1980.
24. Löwenthal A, van Sande M, Karcher D. The differential diagnosis of neurological diseases by fractionating electrophoretically de CSF gamma-globulins. *J Neurochem* 1969; 6: 51-56 apud Zettl UK, Tumani H. Multiple sclerosis & cerebrospinal fluid. Navarra: Blackwell Publishing Ltd; 2005.
25. Kafka V. Die Zerebrospinalflüssigkeit. Deuticke: Leipzig-Wien; 1930 apud Zettl UK, Tumani H. Multiple sclerosis & cerebrospinal fluid. Navarra: Blackwell Publishing Ltd; 2005.
26. Bauer H. Über die Bedeutung der Papierelektrophorese des liquors für die Klinische forschung. *Deutsch Z Nevenheik* 1953; 170: 381-401 apud

- Zettl UK, Tumani H. Multiple sclerosis & cerebrospinal fluid. Navarra: Blackwell Publishing Ltd; 2005.
27. Felgenhauer K. Protein size and cerebrospinal fluid composition. *Klin Wochenschr* 1974; 52: 1158-1164.
 28. Link H, Tibbling G. Principles of albumin and IgG analyses in neurological disorders. III. Evaluation of IgG synthesis within the central nervous system in multiple sclerosis. *Scand J Clin Lab Invest* 1977; 37(5): 397-401.
 29. 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(3): 319-320.
 30. Thompson EJ. The CSF proteins: a biochemical approach. Elsevier: Amsterdam/Nova York/Oxford; 1988.
 31. Tourtellotte WW, Baumhefner RW, Potvin AR. Multiple sclerosis de novo CNS IgG synthesis: effect of ACTH and corticosteroids. *Neurology* 1980; 30(11): 1155-1162.
 32. Laterre EC, Callewaert A, Heremans JF. Electrophoretic morphology of gamma globulins in CSF of multiple sclerosis and other diseases of the nervous system. *Neurology* 1970; 20: 982-990.
 33. Felgenhauer K. The filtration concept of the blood-CSF barrier as basis for the differentiation of CSF proteins. In: Greenwood J, Begley DJ, Segal MB: New concepts of a blood-brain barrier, Plenum Press: Nova York 1995; 209-217.
 34. Machado LR, Livramento JA, Spina-França A. Exame de líquido cefalorraquidiano. In: Mutarelli EG. Manual de exames complementares em neurologia. Sarvier: São Paulo 2006; 241-261.
 35. Puccioni-Sohler M, Machado LR, Canuto R, Takayanagui OM, Almeida SM, Livramento JA. Coleta do líquido cefalorraquidiano, termo de consentimento livre e esclarecido e aspectos éticos em pesquisa:

- recomendações do departamento científico de LCR da Academia Brasileira de Neurologia. *Arq. Neuropsiquiatr* 2002; 60(3A): 681-684.
36. Tintoré M, Rovira A, Río J, Tur C, Pelayo R, Nos C, et al. Do oligoclonal bands add information to MRI in first attacks of multiple sclerosis? *Neurology* 2008; 70: 1079-1083.
 37. Luque FA, Jaffe SL. Cerebrospinal fluid analysis in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007; 79: 341-356.
 38. Antel J, Bar-Or A. Roles of immunoglobulins and B cells in multiple sclerosis: from pathogenesis to treatment. *J Neuroimmunol* 2006; 180(1-2): 3-8.
 39. Villar LM, Garcia-Barragán N, Espiño M, Roldán E, Sádaba M, Gómez-Rial J, et al. Influence of oligoclonal IgM specificity in multiple sclerosis disease course. *Mult Scler* 2008; 14(2): 183-187.
 40. Villar LM, Jasjuan J, González-Porqué P, Plaza J, Sádaba MC, Roldán E, et al. Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2003; 53: 222-226.
 41. Fortini AS, Sanders EL, Weinshenker BG, Katzmann JA. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in the diagnosis of multiple sclerosis. *Am J Clin Pathol* 2003; 120(5): 672-675.
 42. Drulovic J, Stojisavljevic N, Dujmovic I, Sokic D, Mavra M, Levic Z. Findings of cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis. *Srp Arch Celok Lek* 1995; 123(7-8): 191-193.
 43. Mygland A, Trydal T, Vinje BU, Vedeler C. Isoelectric focusing is superior to immunofixation eletrophoresis in diagnosing CNS inflammation. *Acta Neurol Scan* 2007; 115(2): 122-125.
 44. Sellebjerg F, Christiansen M. Qualitative assessment of intrathecal IgG synthesis by isoelectric focusing and immunodetection: interlaboratory reproducibility an interobserver agreement. *Scand J Clin Lab Invest* 1996; 56: 135-143.

45. Annunziata P, Giorgio A, Santi L, et al. Absence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands is associated with delayed disability progression in relapsing-remitting MS patients treated with interferon-B. *J Neurol Sci* 2006; 244: 97-102.
46. Bourahoui A, Seze J, Gutierrez R, et al. CSF isoelectrofocusing in a large cohort of MS and other neurological diseases. *Eur J Neurol* 2004; 11: 525-529.
47. Idiman E, Ozakbas S, Dogan Y, Kosehasanogullari G. The significance of oligoclonal bands in multiple sclerosis: Relevance of demographic and clinical features, and immunogenetic backgrounds. *J Neuroimmunol* 2009; May: in press.
48. Sá MJ, Sequeira L, Rio ME, Thompson EJ. Oligoclonal IgG bands in the cerebrospinal fluid in Portuguese patients with multiple sclerosis: negative results indicate benign disease. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63(2-B): 375-379.
49. Bhigjee A, Moodley K, Ramkissoon K. Multiple sclerosis in KwaZulu Natal, South Africa. *Mult Scler* 2007; 13(9): 1095-1099.
50. Bednarova J, Stourac P, Adam P. Relevance of immunological variables in neuroborreliosis and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2005; 112: 97-102.
51. Koch M, Heersema D, Moster J, Teelken A, De Keyser J. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands and progression of disability in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2007; 14(7): 797-800.
52. Fromont A, Couvreur G, Guiguet M, Giroud M, Caudie C, Moreau T. Comparaison de l'immunofixation après électrophorèse sur gel d'agarose avec la focalisation isoélectrique dans la détection des bande oligoclonales d'IgG du liquide céphalo-rachidien de patients atteints de sclérose en plaques. *Rev Neurol (Paris)* 2005; 161(12): 1183-1190.

53. Miró J, Aguayo F, Garrido JC, Alvarez C, Polo JC, Pascual J, et al. Intrathecal immunoglobulin synthesis in multiple sclerosis: effect of corticosteroids and azathioprine. *Neur Neurol* 1992; 32: 349-353.
54. Wu JS, Zhang MN, Carroll WM, Kermode AG. Characterisation of the spectrum of demyelinating disease in Western Australia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2008; 79(9): 1022-1026.
55. Li B, Dong H, Zhang J, Song X, Guo L. Cerebrospinal fluid IgG profiles and oligoclonal bands in Chinese patients with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2007; 115: 319-324.
56. Nakashima I, Fujihara K, Misu T, Fujimori J, Sato S, Takase S, et al. A comparative study of Japanese multiple sclerosis patients with and without oligoclonal IgG bands. *Mult Scler* 2002; 8: 459-462.
57. Yamout B, Barada W, Tohme RA, Mehio-Sibai A, Khalifeh R, El-Hajj T. Clinical characteristics of multiple sclerosis in Lebanon. *J Neurol Sci* 2008; 270(1-2): 88-93.
58. Tanaka K, Kujuro Y, Suzuki S, et al. Clinical and laboratory features of in-patients with multiple sclerosis in a University Hospital in Tokyo from 1988-2002. *Inter Med* 2005; 44(6): 560-566.
59. Syal P; Prabhakar S; Thussu A; Sehgal S; Khandelwal N. Clinical profile of multiple sclerosis in north-west India. *Neurol India* 1999; 47(1): 12-17.
60. Siritho S, Freedman MS. The prognostic significance of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 2009; 279(1-2): 21-25.
61. Siritho S, Prayoonwiwat N. A retrospective study of multiple sclerosis in Siriraj Hospital, Bangkok, Thailand. *Can j Neurol Sci* 2007; 34(1): 99-104.
62. Das A. A retrospective review of patients with clinically definite multiple sclerosis. *Ann Acad Med Singapore* 1998; 27: 204-209.
63. Chang KH, Lyu RK, Chen CM, Hsu WC, Wu YR, Chen ST, et al. Clinical characteristics of multiple sclerosis in Taiwan: a cross-sectional study. *Mult Scler* 2006; 12: 501-506.

64. Brasher GW, Follender AB, Spiekerman AM. The clinical value of commonly use spinal fluid diagnostic studies in the evaluation of patients with suspected multiple sclerosis. *Am J Man Care* 1998; 4: 1119-1121.
65. Puccioni-Sohler M, Passeri F, Oliveira C, Brandão CO, Papaiz-Alvarenga R. Analysis of cerebrospinal fluid by standard methods. *Arq Neuropsiquiatr* 1999; 57(4): 927-931.
66. Puccioni-Sohler M, Lavrado FP, Bastos RRG, Brandão CO, Papaiz-Alvarenga R. Esclerose múltipla: correlação clínico-laboratorial. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59(1): 89-91.
67. Brandão CO, Ruocco HH, Farias AS, et al. Cytokines and intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis patients during clinical remission. *Arq Neuropsiquiatr* 2005; 63(4): 914-919.
68. Brandão CO, Ruocco HH, Farias AS, Oliveira C, Cendes F, Damasceno BP, et al. Intrathecal immunoglobulin G synthesis and brain injury by quantitative MRI in multiple sclerosis. *Neuroimmunomod* 2006; 13: 89-95.
69. Nakashima I, Fujihara K, Itoyama Y. Oligoclonal IgG bands in Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 1999; 101: 205-206.
70. Kira J. Multiple sclerosis in the Japanese population. *Lancet Neurology* 2003; 2: 117-127.
71. Debouverie M, Lebrun C, Jeannin S, Pittion-Vouyovitch S, Roederer T, Vespignani H. More severe disability of North Africans vs Europeans with multiple sclerosis in France. *Neurology* 2007; 68: 29-32.
72. Rinker JR, Trinkaus K, Naismith RT, Cross RT. Higher IgG index found in African Americans versus Caucasians with multiple sclerosis. *Neurology* 2007; 69: 68-72.
73. Cree BAC, Khan O, Bourdette D, Goodin DS, Cohen JA, Marrie RA, et al. Clinical characteristics of African Americans vs Caucasian Americans with multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 63: 2039-2045.

74. Weinstock-Guttman B, Jacobs KD, Brownscheidles CM, Baier M, Rea DF, Apatoff BR. Multiple sclerosis characteristics in African American patients in the New York state multiples sclerosis consortium. *Mult Scler* 2003; 9: 293-298.
75. Marrie RA, Cutter G, Tyry T, Vollmer T, Campagnolo D. Does multiple sclerosis-associated disability differ between races? *Neurology* 2006; 66: 1235-1240.
76. Cardoso E, Fujuda T, Pereira J, Seixas J, Miranda R, Rogrigues B, et al. Clinical and epidemiological profile of multiple sclerosis in a reference Center in the State of Bahia, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2006; 64(3B): 727-730.
77. Kaufman MD, Johnson SK, Moyer D, Bivens J, Norton HJ. Multiple sclerosis: Severity and progression rate in African American compared with Whites. *Am J Phys Med Rehabil* 2003; 82: 582-590.
78. Keren DF. Optimizing detection of oligoclonal band in cerebrospinal fluid by use of isoelectric focusing with IgG immunoblotting. *Am J Clin Pathol* 2003; 120: 649-651.
79. Mayringer I, Timeltaler B, Deisenhammer F. Correlation between the IgG index, oligoclonal bands in CSF, and the diagnosis of demyelinating diseases. *Eur J Neurol* 2005; 12: 527-530.
80. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br> (último acesso em 10 de abril de 2009).
81. Villar LM, Masjuan J, Sádaba MC, González-Porqué P, Plaza J Bootello A, et al. Early differential diagnosis of multiple sclerosis using a new oligoclonal band test. *Arch Neurol* 2005; 62: 574-577.
82. Imrel K, Greiner E, Hillert J, Masterman T. HLA-DRB1*15 and cerebrospinal-fluid-specific oligoclonal immunoglobulin G bands lower age at attainment of important disease milestones in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2009; 210(1-2): 128-130.

83. Imrel K, Landthlom AM, Hillert J, Masterman T. Multiple sclerosis with and without oligoclonal bands: clinically indistinctable but immunogenetic distinct. *Neurology* 2006; 67: 1062-1064.
84. Callander M, Haghighi S, Landtblom AM, et al. Multiple sclerosis immunopathic trait and HLA-DR(2)15 as independent risk factors in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2007; 13(4): 441-445.
85. Zeman AZJ, Kidd D, McLean BN, Kelly MA, Francis DA, Miller DH, et al. A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1996; 60: 21-30.
86. Arneth B, Birklein F. High sensitivity of free lambda and free kappa light chains for detection of intrathecal immunoglobulin synthesis in cerebrospinal fluid. *Acta Neurol Scand* 2009; 119(1): 39-44.
87. Fischer C, Arneth B, Koehler J, Lotz J, Lackner KJ. Kappa free light chains in cerebrospinal fluid as markers of intrathecal immunoglobulin synthesis. *Clin Chem* 2004; 50-10: 1809-1813.
88. Krakauer M, Schaldemose-Nielse H, Jensen J, Sellebjerg F. Intrathecal synthesis of free immunoglobulin light chains in multiples clerosis. *Acta Neurol Scand* 1998; 98: 161-165.
89. Ferreira ML, Machado MI, Vilela ML, Guedes MJ, Ataíde L, Santos S, et al. Epidemiology of 118 cases of multiple sclerosis after 15 years of follow-up on the reference center of Hospital da Restauração, Recife, Pernambuco, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2004; 62(4): 1027-1032.
90. Alves-Leon SV, Malfetano FR, Pimentel MLV, Estrada CLD, Pereira VCSR, Liem AM, et al. Multiple sclerosis autcome and morbi-mortality of a Brazilian cohort patients. *Arq Neuropsiquiatr* 2008; 66(3B): 671-677.
91. Callegaro D, Goldbaum M, Morais L, Tilbery CP, Moreira MA, Gabbai AA, et al. The prevalence of multiple sclerosis in the city of São Paulo, Brazil. *Acta Neurol Scan* 2001; 104(2): 208-213.

92. Lana-Peixoto MA, Frota E, Campos GB, Botelho CM, Aragão AL. The prevalence of multiple sclerosis in Belo Horizonte. *Mult Scler* 2002; 8(suppl): S38.
93. Arruda WO, Scola RH, Teive HA, Werneck LC. Multiple sclerosis: report on 200 cases from Curitiba, Southern Brazil and comparison with other Brazilian series. *Arq Neuropsiquiatr* 2001; 59(2A): 165-170.
94. Gama PD, Trigo LX, Andrade CRR, Sala CR. Epidemiological study of multiple sclerosis in the city of Sorocaba, Brazil. *Arq Neuropsiquiatr* 2004; 62(1): P13.
95. Gay F. Activated microglia in primary MS lesions: defenders or agressors? *Ins MS J* 2007; 14(3): 78-83.
96. Weber F. Effects of auto-reactive T cells and cytokines in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Int MS J* 2002; 9(1): 29-35.
97. Kallmann BA, Rieckmann P. Chemokines and MS lesion development. *Ins MS J* 2002; 9(3): 101-107.

APÊNDICE

SUBMISSÃO DE ARTIGO

#ANP-283 : Study of oligoclonal bands restricted to the cerebrospina...

Submissão

Autores	Paulo Diniz da Gama, Luis Ramos Machado, Jose Antonio Livramento, Hélio Rodrigues Gomes, Tarso Adoni, Angelina Maria Martins Lino, Paulo Eurípedes Marchiori, Rogério de Rizo Morales, Marco Aurélio Lana-Peixoto, Dagoberto Callegaro	
Título	Study of oligoclonal bands restricted to the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients in the city of São Paulo	
Documento Original	ANP-283-13127-62510-1-SM.DOC 2009-05-24	
Doc. Sup.	Nenhum	INCLUIR DOCUMENTO SUPLEMENTAR
Submetido por	Paulo Diniz Gama
Data de submissão	May 24, 2009 - 08:42 PM	
Seção	Artigos / Articles	
Editor	Luis Machado
Comentários do Autor	O artigo possui urgência para publicação por se tratar de tese de doutorado.	

Status

Status	Em Avaliação
Iniciado	2009-05-24
Última alteração	2009-05-24

Metadados da Submissão

EDITAR METADADOS

Autores

Nome	Paulo Diniz da Gama
Instituição	Faculdade de Medicina da PUC-SP - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
País	Brasil
Resumo da Biografia	Possui graduação em Medicina pela Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (1990), especialização em Neurologia e Neurocirurgia pela Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, Mestrado em Medicina (Neurologia) pela Universidade de São Paulo (1996), especializado em Neurofisiologia-Eletroneuromiografia pela Faculdade de Medicina da UNESP de Botucatu. Atualmente é posgraduando nível doutorado da Universidade de São Paulo. Diretor Clínico do Instituto do Cérebro de Sorocaba e responsável pelo serviço de Eletroneuromiografia e Potenciais Evocados. Responsável pelo Centro de Referência para o Tratamento da Esclerose Múltipla do Conjunto Hospitalar de Sorocaba. Professor de Neurologia da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo. Tem experiência na área Neurologia, Neurofisiologia Clínica - Eletroneuromiografia e em Neuroimunologia.

Contato Principal para correspondência.

Nome Luis Ramos Machado
Instituição FMUSP
País Brasil
Resumo da Biografia Professor de Neurologia FMUSP

Nome Jose Antonio Livramento
Instituição FMUSP
País Brasil
Resumo da Biografia Professor de Neurologia FMUSP

Nome Hélio Rodrigues Gomes
Instituição FMUSP
País Brasil
Resumo da Biografia FMUSP

Nome Tarso Adoni
Instituição FMUSP
País Brasil
Resumo da Biografia FMUSP

Nome Angelina Maria Martins Lino
Instituição FMUSP
País Brasil
Resumo da Biografia FMUSP

Nome Paulo Eurípedes Marchiori
Instituição FMUSP
País Brasil
Resumo da Biografia FMUSP

Nome Rogério de Rizo Morales
Instituição Universidade de Uberlândia
País Brasil
Resumo da Biografia Universidade de Uberlândia

Nome Marco Aurélio Lana-Peixoto
Instituição Universidade Federerel de Minas Gerais
País Brasil
Resumo da Biografia Universidade Federal de Minas Gerais

Nome Dagoberto Callegaro
Instituição FMUSP
País Brasil
Resumo da Biografia FMUSP

Título e Resumo	
Título	Study of oligoclonal bands restricted to the cerebrospinal fluid in multiple sclerosis patients in the city of São Paulo
Resumo	<p>Abstract – The frequency of oligoclonal bands (OCB) in the cerebrospinal fluid (CSF) not paired with those in serum of multiple sclerosis (MS) patients varies widely in different populations. The objective of this study was to determine the frequency of OCB in the CSF not present in serum of a group of Brazilian MS patients. Techniques used to detect OCB consisted of isoelectric focusing followed by immunoblotting. Oligoclonal bands present in the CSF but not in serum was found in 49 (54.4%) out of 90 patients with clinically definite MS; in five (31.2%) of the 16 patients with clinically isolated syndrome; in 7 (17.9%) of 39 patients with chronic inflammatory disorders of the central nervous system (CIDCNS), and in none of the individuals with no neurological condition (control group). The specificity of the method was 100% when compared to the control group and 82.1% when compared to the CIDCNS group. These results suggest that the frequency of CSF OCB is much lower in Brazilian MS patients than that reported in MS series from Caucasian populations.</p>
Indexação	
Classificação de Assunto	D. Desmielinizantes; Ex Auxiliares
Palavras-chave	multiple sclerosis; cerebrospinal fluid; oligoclonal bands; Brazilian population
Idioma	en
Agências de Financiamento	
Agências	Department of Neurology and Neurosurgery, College of Medical Science of the University of São Paulo, São Paulo SP, Brazil; Brazilian Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (BCTRIMS).