

RBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Avaliação dos vasos, da agregação plaquetária e do mecanismo da anticoagulação natural nas doenças coronarianas 183

Coelho, E.A.F.; Vieira, L.M.; Dusse, L.M.S.; Reis, C.V.; Freitas, M.L.; Diniz, M.C.; Costa, C.C. & Carvalho, M.G.

Vessels, platelet aggregation and natural anticoagulation mechanism evaluations in coronarian diseases

Meio CE e Glutaraldeído na preservação de plaquetas para o controle de qualidade em hematimetria 191

Fernanda Emendörfer; Lígia Maria Claro; Samuel Ricardo Comar;

Aguinaldo José do Nascimento & Maria Suely Soares Leonart

CE medium and glutaraldehyde in platelets preservation for control quality in hematology

Otimização da técnica de RT-PCR para avaliação da expressão gênica do receptor da LDL em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com medicamentos hipolipemiantes 195

Luis Salazar Navarrete, Mário Hiroyuki Hirata & Rosário Dominguez Crespo Hirata

Optimized RT-PCR assay to evaluate LDL receptor mRNA levels in peripheral mononuclear cells from hypercholesterolemic individuals treated with lipid-lowering drugs

Efeitos de corantes naturais nos níveis séricos de colesterol - HDL em ratos hiperlipidêmicos 201

Silva, R.C.; Valente, S. T. X.; Oliveira, T. T.; Pinto, A. S. & Costa, N. M. B.

Natural dyes effects on seric levels of cholesterol and HDL-cholesterol in hyperlipidemic rats

Artigo de revisão

Infecções oportunistas por protozoários parasitos: uma revisão sobre *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* e microsporídios 205

Geraldo Atílio De Carli

Opportunistic infections caused by protozoan parasites: a review of *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* and microsporidia

Beta-Lactamase de Espectro Estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial 215

Carlos Henrique Pessoa de Menezes e Silva

Extended-Spectrum Beta-Lactamase: definitions, clinical relevance and laboratorial detection

Perfil eletroforético das proteínas e concentração das imunoglobulinas plasmáticas em pacientes assintomáticos e sintomáticos portadores de HIV 221

Queiroz, M.G.R.; Oliveira, E.M.; Santos, M.S.; Holanda, B.A.P.; Alencar, N.M.N. & Melo, C.L.

Proteins' electrophoretic profile and immunoglobulins plasmatics concentration in asymptomatics and symptomatics patients infected by HIV

Tireotropina em sangue seco em papel filtro: uma nova alternativa de uso do kit ACS:180™ em luminômetros manuais ou semi-automáticos 225

Eurico Camargo Neto

Thyrotropin in dried blood filter paper: the alternative use for TSH-ACS:180™ kit in manual or semi-automatic luminometers

Prevalência de triglicerídeos em pessoas de diversas faixas etárias da cidade de Manaus 229

Paulo Roberto Castro da Costa; Nívea Maria Pedroza Marques; Edvar Fernandes Filho;

Tirza Peixoto Mattos; Maria Rosa Lozano Borrás; Ivete de Araújo Roland & Manoela Oliveira Lopes

Triglyceride's prevalence among people with different ages

Estabelecimento dos valores normais do RDW para a população de Curitiba 231

Paulo H. da Silva, Mariella Zaroni, Samuel R. Comar & Hemerson B. Alves

Corpuscular constant (RDW) as reference value for eritogram

3

VOLUME 32

2000

Avaliação dos vasos, da agregação plaquetária e do mecanismo da anticoagulação natural nas doenças coronarianas*

Vessels, platelet aggregation and natural anticoagulation mechanism evaluations in coronarian diseases

Coelho, E.A.F.¹; Vieira, L.M.¹; Dusse, L.M.S.¹; Reis, C.V.¹; Freitas, M.L.²; Diniz, M.C.²; Costa, C.C.² & Carvalho, M.G.¹

RESUMO - Este trabalho teve como principal objetivo investigar a presença de lesão vascular e seu efeito sobre a competência funcional do mecanismo da anticoagulação natural. Foram analisadas 45 amostras de sangue de pacientes com angina de peito (n=8) e infarto agudo do miocárdio (n=11), indivíduos com alto risco para desenvolverem essas doenças, porém, assintomáticos (n=16) e de indivíduos sadios empregados como controle (n=10). Foram realizadas a avaliação de trombomodulina (marcador de lesão endotelial), da agregação plaquetária, do fibrinogênio, do fator VIII e da proteína C, essa envolvida no sistema da anticoagulação natural. Os níveis de trombomodulina, fator VIII e fibrinogênio se mostraram elevados nos pacientes com infarto e angina, ao contrário da proteína C, que se mostrou diminuída nesses pacientes, quando comparados ao controle. Diferenças entre os grupos controle e de risco foram observadas apenas para o teste da agregação plaquetária, cujos resultados foram similares para os grupos de risco, angina e infarto, sugerindo que este teste pode ser utilizado como um parâmetro preditivo de risco para doença coronariana. Uma interpretação dos resultados permite estabelecer a ocorrência de lesão endotelial e sua consequência sobre a competência funcional do sistema da anticoagulação em pacientes com tais doenças, resultando em um desequilíbrio entre procoagulantes e anticoagulantes, o que favorece a formação de trombo.

UNITERMOS - Agregação plaquetária; trombomodulina; proteína C; fator VIII; fibrinogênio.

SUMMARY - The present work had as aim to investigate the presence of vascular lesion and its effect on the functional competence of the natural anticoagulation mechanism. There were analysed 45 blood samples including patients with angina pectoris (n=8) and acute myocardial infarction (n=11), besides asymptomatic individuals with high risk for developing these diseases (n=16) and a normal group as control (n=10). The blood samples were assayed to measure an endothelium lesion marker (thrombomodulin), platelet aggregation, fibrinogen, factor VIII and protein C, the last one involved in the natural anticoagulation system. Data analyses has revealed that thrombomodulin, factor VIII and fibrinogen plasma levels showed significantly elevated in patients with acute myocardial infarction and angina pectoris groups compared to controls. Contrarily, decreased levels of protein C were observed in these patients compared to controls. Significant differences between the control and risk factors groups were observed for the platelet aggregation test, whose results were similar to the groups of risk factors, angina pectoris and acute myocardial infarction, which suggests that this test may be used as a predictive parameter of risk for coronarian disease. A whole interpretation of the results allows to establish the endothelial lesion occurrence and its consequence on the functional competence of the anticoagulation system in patients with such diseases, leading to an imbalance between procoagulants and natural anticoagulants, which favors the thrombus formation.

KEY WORDS - Platelet aggregation; thrombomodulin; protein C; factor VIII; fibrinogen.

INTRODUÇÃO

As doenças cardiovasculares são responsáveis por aproximadamente 30% das causas de morte em todo o mundo, o que representa cerca de 15 milhões de óbitos anuais. Aproximadamente a metade desses óbitos está associada à doença arterial coronariana¹.

A doença arterial coronariana compreende o infarto agudo do miocárdio (IAM) e a angina de peito, doenças nas quais o indivíduo possui uma exacerbação da ativação do mecanismo de coagulação resultante da lesão ao endotélio vascular. Vários trabalhos têm mostrado uma estreita correlação entre as doenças coronarianas e alguns fatores predisponentes, tais como a hi-

Recebido em 30/3/2000

Aprovado em 05/7/2000

*Prêmio SBAC • XXVII CBAC, Recife, PE, 2000

¹Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais

²Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

percolesterolemia, a hipertensão arterial sistêmica e o tabagismo. Tais fatores concorrem sinergicamente provocando alterações que resultam em lesão vascular, ativação das plaquetas e da cascata da coagulação².

Recentes pesquisas têm sido conduzidas no sentido de se buscar técnicas que sejam capazes de detectar precocemente alterações de componentes do sistema hemostático nestas doenças³. Julgando-se a importância do assunto, pela sua gravidade e pela alta incidência dos eventos cardíacos, o uso de marcadores de lesão vascular, de ativação plaquetária e de outros parâmetros hemostáticos que possam indicar ativação do sistema da coagulação torna-se extremamente importante, uma vez que, o episódio agudo advém da lesão endotelial e da formação do coágulo.

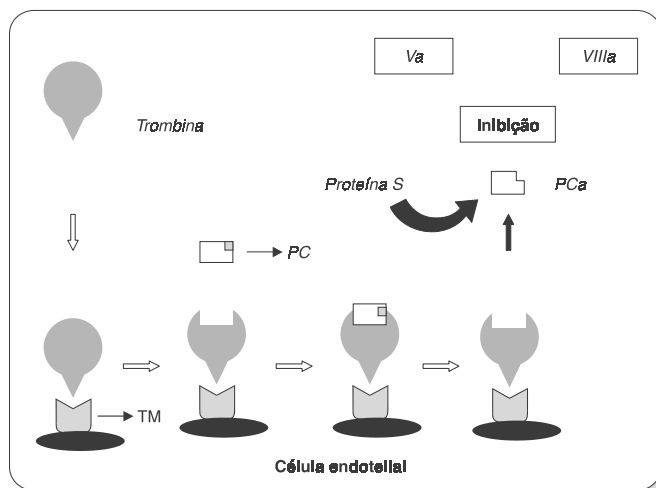
A disfunção endotelial tem sido considerada como uma etapa essencial para o desenvolvimento da doença clínica, uma vez que poderá resultar na ativação plaquetária e da cascata da coagulação. Assim, o estudo de marcadores desse processo merece especial atenção⁴. Das substâncias liberadas pelo endotélio vascular lesado, a trombomodulina (TM) vem sendo considerada como o melhor marcador de lesão vascular⁵. Além da TM, o nível plasmático do fator von Willebrand (FvW) também assume importância, considerando-se que o mesmo é produzido e estocado no subendotélio vascular e liberado quando há lesão endotelial⁶. Sabe-se que esse fator forma um complexo com o fator VIII (FVIII), estabilizando-o⁷. Considerando a inter-relação entre os níveis de FvW e de FVIII, pode-se estimar indiretamente os níveis plasmáticos de FvW e, conseqüentemente, o grau de lesão endotelial, por meio da determinação da atividade do FVIII nos indivíduos com doença arterial coronariana⁸.

A proteína C (PC), um importante anticoagulante natural, quando ativada, inibe a formação de fibrina pela inativação proteolítica dos fatores V e VIII ativados (FVa e FVIIIa)⁹. O principal ativador da PC consiste em um complexo formado entre a TM, presente nas células endoteliais, e a trombina¹⁰. Quando ocorre lesão vascular e ruptura da camada de células endoteliais, com posterior liberação de substâncias nativas para o plasma, como a TM, é esperada uma menor ativação do sistema da PC, uma vez que, a TM plasmática é estruturalmente menos funcional que a TM endotelial¹¹. Sendo assim, a formação do trombo seria favorecida, pois se obterá uma relação inversa entre o aumento dos níveis plasmáticos de TM e uma menor ativação da PC. Por conseqüência, haveria uma menor inativação dos FVa e FVIIIa, resultando em maior disponibilidade desses atuando no mecanismo da coagulação.

A Figura 1 ilustra o sistema de ativação da PC, através do complexo formado entre a trombomodulina e a trombina na superfície das células endoteliais e o seu respectivo mecanismo de ação.

As plaquetas têm sido investigadas quanto ao seu grau de ativação nos indivíduos com doença arterial coronariana, já que as mesmas possuem uma importância fundamental na formação do coágulo¹³. O estudo da agregação plaquetária em pacientes com IAM tem revelado uma maior atividade plaquetária quando

FIGURA 1



Representação esquemática da ativação da proteína C. A interação da trombina com a trombomodulina (TM), ligada à célula endotelial, resulta na ativação da proteína C (PCa). A interação da proteína S com a PCa leva à inibição da atividade dos fatores V e VIII ativados (Adaptado de Catalano, P. M.¹²)

comparada aos indivíduos normais. A contribuição da ativação plaquetária na ocorrência do IAM pode ser avaliada pelo fato de que pacientes com doença arterial coronariana tratados com drogas antiplaquetárias apresentaram uma menor incidência de infarto recorrente em relação àqueles que não faziam uso dessas drogas, o que suporta a hipótese de que uma atividade plaquetária aumentada pode ser considerada como um fator de risco importante para ocorrência das doenças cardiovasculares¹⁴. Adicionalmente, fatores de risco para doenças cardiovasculares, como o tabagismo, a hipercolesterolemia e a hipertensão arterial sistêmica são também citados como fatores independentes, que levam a uma persistente ativação plaquetária, o que poderia contribuir para a ocorrência de eventos trombóticos^{15,16,17}.

Estudos clínicos e epidemiológicos, tanto de corte como prospectivos, sugerem um importante papel do fibrinogênio como um fator de risco para a ocorrência das doenças vasculares coronarianas¹⁸. O fibrinogênio é considerado um fator de risco direto e independente para a incidência das doenças coronarianas, bem como, uma associação entre seus níveis plasmáticos diminuídos e um baixo risco de desenvolver essas doenças tem sido também observada¹⁹. Kohler *et al.* (1998) relataram o encontro de níveis significativamente elevados de fibrinogênio em pacientes com IAM, quando comparados a indivíduos normais²⁰.

O aumento da freqüência e gravidade das doenças cardiovasculares têm despertado o interesse dos profissionais da área de saúde e da população em geral. Muito já se conhece sobre alguns mecanismos que levam às doenças cardiovasculares e diversos trabalhos estão em andamento. Porém, muitos aspectos relacionados à participação do sistema hemostático nessas doenças ainda permanecem obscuros.

É sabido que a hemostasia depende do equilíbrio entre procoagulantes e anticoagulantes e que a lesão vascular pode contribuir para romper esse equilíbrio. Assim sendo, esse trabalho teve como motivação prin-

principal a investigação da hipótese de que a possível lesão vascular que induz às doenças cardiovasculares favorece a formação de trombos, especialmente por comprometer a eficiência do sistema da anticoagulação natural mediado pelo complexo trombomodulina-trombina e a PC.

Dessa forma, a análise e interpretação dos resultados obtidos nesse trabalho, poderão contribuir para um melhor entendimento sobre o mecanismo da hemostasia/coagulação nas doenças cardiovasculares, envolvendo os vasos, as plaquetas e outros parâmetros hemostáticos de importância nos sistemas da coagulação e da anticoagulação natural.

Os objetivos específicos do presente trabalho foram o de investigar se ocorre lesão vascular nos pacientes com infarto agudo do miocárdio e angina de peito, e nos indivíduos com fatores de risco para desenvolverem essas doenças, porém, ainda assintomáticos, mediante a dosagem de trombomodulina e de FVIII; investigar o efeito da possível lesão vascular sobre o mecanismo da anticoagulação natural, mediado pela trombomodulina, nos pacientes com infarto agudo do miocárdio e angina de peito, e nos indivíduos com fatores de risco para desenvolverem essas doenças, porém, ainda assintomáticos; determinar o perfil de ativação plaquetária, por meio do teste de agregação plaquetária, em pacientes com infarto agudo do miocárdio e angina de peito, e nos indivíduos com fatores de risco para desenvolverem essas doenças, porém, ainda assintomáticos; determinar os níveis plasmáticos de fibrinogênio nos pacientes com infarto agudo do miocárdio e angina de peito, e nos indivíduos com fatores de risco para desenvolverem essas doenças, porém, ainda assintomáticos e verificar se a presença e a intensidade das alterações do sistema da anticoagulação natural, das plaquetas e de outros parâmetros estudados refletem a gravidade das doenças coronarianas nos pacientes estudados.

CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

Casuística

Foi avaliado um total de 45 indivíduos distribuídos em quatro grupos compreendendo voluntários aparentemente saudáveis (n=10), como controle; indivíduos com fatores de risco para desenvolverem doenças cardiovasculares, porém, ainda assintomáticos (n=16), pacientes com angina de peito (n=8) e com infarto agudo do miocárdio (n=11). Os controles normais foram selecionados da comunidade em geral e os indivíduos com fatores de risco foram selecionados da comunidade em geral e do Hospital Socor (Belo Horizonte, M.G.). Os pacientes com doenças cardiovasculares foram selecionados da rotina de admissão da Santa Casa de Misericórdia (Belo Horizonte, MG). Este trabalho obteve parecer favorável da Comissão de Ética em Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia. Todos os participantes foram devidamente informados sobre os objetivos da pesquisa e as amostras de sangue foram obtidas após a assinatura do Termo de Consentimento Pós-Informado.

TABELA I
Tamanho da amostra (n), distribuição por sexo, média de idade e faixa etária nos quatro grupos estudados

Grupos	Participantes (n)	Sexo masculino (n)	Sexo feminino (anos)	Média de idade (anos)	Faixa etária (anos)
Controle	10	06	04	51	34 - 65
Risco	16	07	09	40	31 - 52
Angina	08	05	03	50	38 - 64
Infarto	11	07	04	50	33 - 65
Total	45	25	20	48	31 - 65

Na Tabela I, são apresentados os dados quanto ao tamanho (n), sexo e idade nos quatro grupos estudados.

Critérios de inclusão e exclusão

O limite de idade fixado foi de 65 anos e os pacientes com IAM foram pareados quanto à idade em relação ao grupo controle. Os indivíduos com fatores de risco apresentavam, no mínimo, dois fatores de risco para o ingresso na pesquisa: tabagismo, hipercolesterolemia (níveis de HDL < 45 mg/dL e níveis de LDL > 130 mg/dL) e/ou elevação da pressão sanguínea (pressão arterial sistólica ≥ 140 mm Hg e pressão arterial diastólica ≥ 85 mm Hg). Pacientes diabéticos ou em uso de medicamentos que interferem no sistema hemostático foram excluídos. No grupo controle e no grupo de indivíduos com fatores de risco foram feitas algumas determinações de parâmetros bioquímicos.

O diagnóstico dos pacientes com angina de peito foi feito através de exame clínico acusando sintomatologia compatível com dor típica da angina, com níveis normais das enzimas CPK (homem 38 a 190 U/L e mulher 26 a 165 U/L) e CK-MB (até 24 U/L).

O diagnóstico dos pacientes com IAM foi feito através de exame clínico e a caracterização de sintomatologia característica (dor no peito e formigamento), com quadro clínico de dor anginosa típica com duração superior a 30 minutos, sugestivos de IAM com alterações eletrocardiográficas caracterizadas pela presença de supra desnivelamento do segmento ST ≥ 1 mm em duas derivações periféricas contíguas ou ≥ 2 mm em duas derivações pré-cordiais contíguas, acompanhadas da presença de ondas Q patológicas, acrescidas de níveis séricos aumentados da enzima creatinofosfoquinase e sua fração MB.

Material

Uma amostra de 15mL de sangue venoso foi colhida de cada participante em dois tubos de 5 mL contendo citrato de sódio 3.8% (1 mL para 9 mL de sangue) e em um tubo sem anticoagulante, usando sistema Vacutainer (Becton - Dickinson). As amostras de sangue foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos. Amostras de plasma foram separadas e armazenadas em freezer a -30 °C, até o momento do uso.

Métodos

Determinação da trombomodulina

Foi utilizada a técnica ELISA de sanduíche, utili-

zando-se o kit comercial (Asserachrom Thrombomodulin, Diagnostica Stago, cat. no 00445, Asnières-sur-Seine, França), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A leitura foi feita em equipamento Bio-Rad (modelo 550).

Dosagem do fator VIII

Foi realizada empregando-se o reagente Factor deficient plasma - VIII human (DiaMed, cat. n° 315361, Cressier sur Morat, Suíça), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. Os tempos foram medidos em coagulômetro ST₄-BIO (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, França).

Determinação da atividade da proteína C

As amostras foram analisadas empregando-se o reagente Staclo - Protein C (Diagnostica Stago, cat. n° 00747, Asnières-sur-Seine, França), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. Os testes foram realizados no coagulômetro ST₄-BIO (Diagnostica Stago, Asnières-sur-Seine, França).

Preparação do plasma rico em plaquetas (PRP) e do plasma pobre em plaquetas (PPP)

As amostras de sangue foram centrifugadas a 500 rpm por 5 minutos para a obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP). Deste, foi retirada uma pequena alíquota para a contagem eletrônica de plaquetas (Contador eletrônico, modelo T-890, Coulter Electronics, USA). A suspensão de plaquetas foi então padronizada para 150.000 a 250.000 plaquetas por milímetro cúbico de sangue. Para a realização do teste de agregação plaquetária, uma alíquota de 450µL do PRP de cada amostra foi utilizada. As amostras remanescentes foram centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos, para a obtenção do plasma pobre em plaquetas (PPP). Do PPP foram retiradas duas alíquotas para a contagem eletrônica de plaquetas e padronizadas para 1.000 a 14.000 plaquetas por milímetro cúbico de sangue. Uma alíquota de 500µL do PPP foi utilizada no teste, para a calibração do aparelho. Amostras hemolisadas e lipêmicas foram descartadas.

Determinação da agregação plaquetária

Os testes de agregação plaquetária foram realizados no agregômetro "Platelet aggregation chromogenic kinetic system" (modelo PACKS-4, Helena Laboratories, Beaumont, Texas, EUA), seguindo rigorosamente as instruções do fabricante. Após o preparo do PPP e do PRP, as amostras permaneciam 20 minutos em repouso, para a estabilização da função plaquetária. O agente agregante utilizado foi a adenosina difosfato (ADP) (Helena Laboratories, cat. n° 5366, Beaumont, Texas, USA), em concentração final de 10µM. O reagente foi reconstituído com 1mL de água bidestilada e dividido em alíquotas de 60µL, as quais foram acondicionadas em tubos Eppendorff, vedadas com parafim e estocadas em freezer a -20°C, até o momento do uso. O sistema fotométrico registra as alterações na trans-

mitância do PRP conseqüente à agregação das plaquetas. Após 10 minutos, a curva de agregação plaquetária é visualizada na tela, bem como dados do agente agregante utilizado, a sua concentração, a porcentagem e o tempo necessário para se obter o máximo de agregação plaquetária da amostra. O teste foi realizado até no máximo de três horas após a colheita da amostra de sangue.

Determinação do fibrinogênio

Um volume de 1 mL do PPP das amostras foi utilizado para a determinação colorimétrica dos níveis de fibrinogênio. A concentração de fibrinogênio foi determinada pelo método de Goodwin modificado, citado por Carvalho & Silva (1988)²¹.

As amostras de soro foram utilizadas para a realização de exames bioquímicos necessários para se definir a inclusão dos indivíduos no grupo controle ou no grupo dos indivíduos com fatores de risco para desenvolver doenças coronarianas, porém, ainda assintomáticos. As funções hepática e renal, bem como os níveis plasmáticos de lípidos e glicose foram avaliados.

Análise estatística

Foi calculada utilizando-se o programa Systat, versão 8.03. Os resultados são apresentados como média e desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA, seguindo-se da aplicação do teste LSD de Fisher. Foram determinadas a correlação de Pearson entre os parâmetros estudados e o teste de Bonferroni para se obter o grau de significância da correlação. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

A Tabela II mostra (média $\pm$ desvio padrão) os resultados das determinações de trombomodulina (TM), fator VIII (FVIII), proteína C ativada (PCa), agregação plaquetária (agregação) e fibrinogênio, em indivíduos dos grupos controle e de fatores de risco, e em pacientes dos grupos angina e infarto.

Em relação à determinação dos níveis plasmáticos de TM, os grupos controle e dos indivíduos com fato-

TABELA II
Resultados das determinações de trombomodulina (TM), fator VIII (FVIII), proteína C ativada (PCa), agregação plaquetária (agregação) e fibrinogênio nos quatro grupos estudados

Parâmetros	Grupos			
	Controle	Risco	Angina	Infarto
TM (ng/mL) (n=45)	3.0 ($\pm$ 1.5) (n=10)	3.1 ($\pm$ 1.6) (n=16)	13.6 ($\pm$ 4.3) (n=8)	24.1 ($\pm$ 8.1) (n=11)
FVIII (%) (n=42)	51.6 ($\pm$ 17.9) (n=9)	67.1 ($\pm$ 39.9) (n=14)	117.4 ($\pm$ 42.9) (n=8)	123.4 ($\pm$ 53.5) (n=11)
PCa (%) (n=40)	92.8 ($\pm$ 17.4) (n=10)	100.1 ($\pm$ 22.8) (n=14)	72.9 ($\pm$ 24.0) (n=7)	60.4 ($\pm$ 22.1) (n=9)
Agregação (%) (n=40)	80.0 ($\pm$ 6.4) (n=9)	93.0 ($\pm$ 5.9) (n=16)	92.0 ($\pm$ 3.2) (n=6)	92.0 ($\pm$ 2.4) (n=9)
Fibrinogênio (mg/dL) (n=44)	236.0 ($\pm$ 60.8) (n=10)	252.0 ($\pm$ 51.5) (n=16)	374.0 ($\pm$ 95.7) (n=7)	396.0 ($\pm$ 91.6) (n=11)

O desvio padrão da média está expresso entre parênteses e para cada parâmetro é apresentado o número de casos estudados.

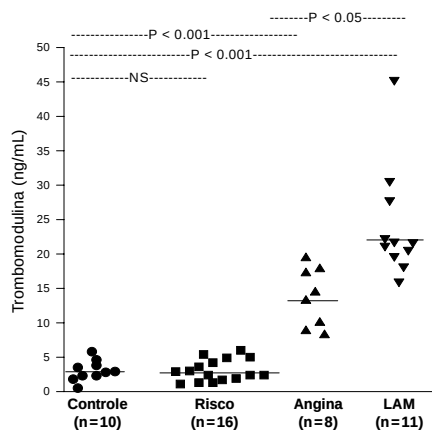


Fig. 2 - Resultados das determinações dos níveis de trombotomodulina nos grupos estudados e número de amostras (n). As barras horizontais entre os valores obtidos indicam os valores médios para cada grupo. As barras horizontais representam o nível de significância entre os grupos.

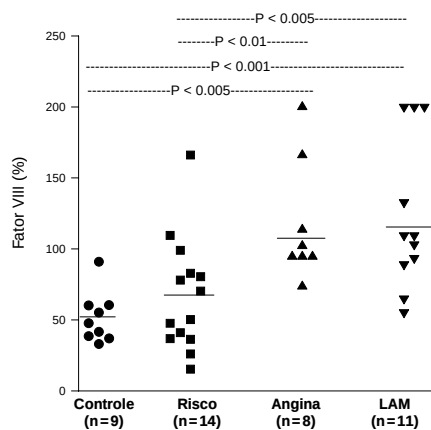


Fig. 3 - Resultados das determinações dos níveis de atividade do fator VIII nos grupos estudados e número de amostras (n). As barras horizontais entre os valores obtidos indicam os valores médios para cada grupo. As barras horizontais representam o nível de significância entre os grupos.

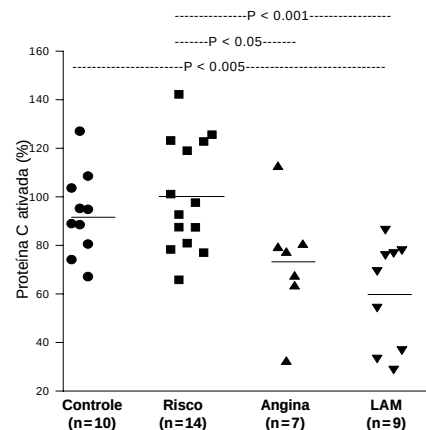


Fig. 4 - Resultados das determinações dos níveis de atividade da proteína C nos grupos estudados e número de amostras (n). As barras horizontais entre os valores obtidos indicam os valores médios para cada grupo. As barras horizontais representam o nível de significância entre os grupos.

res de risco apresentaram diferença significativa em relação aos grupos de pacientes com IAM e angina de peito ($p < 0.001$), sendo também encontrada diferença significativa entre os grupos IAM e angina ($p < 0.05$), como mostra a Figura 2.

Em relação à dosagem dos níveis de FVIII, o grupo controle apresentou diferença significativa em relação aos grupos de pacientes com IAM ($p < 0.001$) e angina de peito ($p < 0.005$), sendo observada também diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo dos indivíduos com fatores de risco e os grupos IAM ($p < 0.005$) e angina ($p < 0.01$) (Figura 3).

Em relação aos resultados da atividade da PC, como mostrado na Figura 4, o grupo controle apresentou diferença significativa em relação ao grupo IAM ($p < 0.005$) e o grupo dos indivíduos com fatores de risco apresentou diferença significativa em relação aos grupos de pacientes com IAM ($p < 0.001$) e angina de peito ($p < 0.05$).

Na determinação do perfil de agregação plaquetária, o grupo controle apresentou diferença estatisticamente significativa em relação aos grupos de pacientes com IAM, com angina de peito e com o grupo dos indivíduos com fatores de risco ($p < 0.001$). O grupo dos indivíduos com fatores de risco não apresentou diferença significativa quando comparado aos grupos de pacientes com doenças cardiovasculares (Figura 5).

A determinação plasmática de fibrinogênio mostrou que os grupos de pacientes com IAM e com angina de peito apresentaram médias significativamente maiores quando comparadas às médias obtidas para os grupos controle e dos indivíduos com fatores de risco para doenças cardiovasculares ($p < 0.005$), estes dois últimos sem diferença estatisticamente significativa, como mostrado na Figura 6.

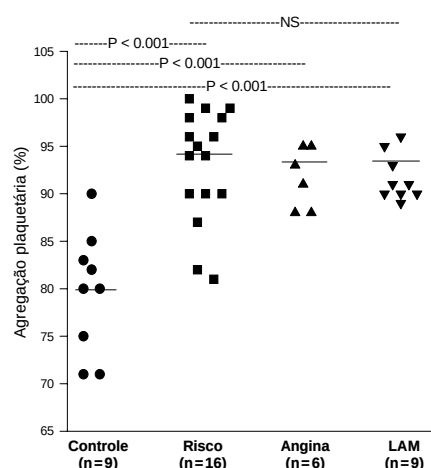


Fig. 5 - Resultados das determinações da agregação plaquetária nos grupos estudados e número de amostras (n). As barras horizontais entre os valores obtidos indicam os valores médios para cada grupo. As barras horizontais representam o nível de significância entre os grupos.

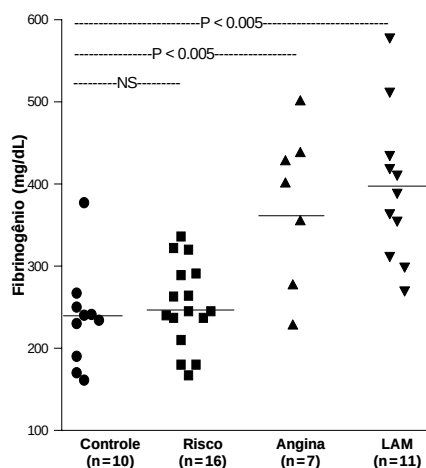


Fig. 6 - Resultados das determinações dos níveis de fibrinogênio nos grupos estudados e número de amostras (n). As barras horizontais entre os valores obtidos indicam os valores médios para cada grupo. As barras horizontais representam o nível de significância entre os grupos.

TABELA III
Correlação de Pearson entre os parâmetros estudados incluindo TM, FVIII, PCa, Agregação plaquetária, Fibrinogênio

Parâmetros	TM	FVIII	PC	Agregação	Fibrinogênio
TM	1.00000				
FVIII	0.44226	1.00000			
PCa	-0.56328	-0.41591	1.00000		
Agregação	0.17308	0.19994	-0.16053	1.00000	
Fibrinogênio	0.67747	0.31165	-0.34502	0.23906	1.00000

TABELA IV
Diferença entre os resultados dos parâmetros hemostáticos avaliados em amostras de sangue de pacientes do grupo infarto e de indivíduos do grupo controle, com os respectivos valores de significância (P)

Parâmetros	Grupos		P
	Infarto	Controle	
TM (ng/mL)	24.1	3.0	< 0.001
FVIII (%)	123.4	51.6	< 0.001
PCa (%)	60.4	92.8	< 0.005
Agregação plaquetária (%)	92.0	80.0	< 0.001
Fibrinogênio (mg/dL)	396.0	236.0	< 0.005

Foi realizado o teste da correlação de Pearson entre os parâmetros estudados, com a finalidade de se determinar a existência ou não de correlação entre os resultados obtidos. Pela análise da Tabela III, verifica-se uma correlação positiva e significativa entre a TM e o fibrinogênio ($r=0,678$; $p=0,0012$). Uma correlação negativa e significativa foi observada entre a proteína C ativada (PCa) e a TM ($r=-0,563$; $p=0,0043$) e uma correlação negativa, porém não significativa, entre a PCa e o FVIII ($r=-0,416$; $p=0,190$), bem como uma correlação positiva e significativa entre a TM e o FVIII ($r=0,442$; $p=0,04$).

A Tabela IV mostra uma comparação entre os grupos controle e de infartados, com os respectivos resultados dos parâmetros e com as diferenças significativas.

DISCUSSÃO

A análise dos resultados da dosagem da TM sugere a presença de uma crescente lesão endotelial com a evolução do quadro clínico, uma vez que foi obtida uma correlação direta entre a gravidade clínica e os níveis plasmáticos de TM. Assim, indivíduos assintomáticos porém, com fatores de risco importantes, não diferiram do controle, embora já apresentassem uma discreta elevação dos níveis de TM. O nível plasmático de TM obtido no grupo controle foi semelhante ao encontrado por Öhlin *et al.* (1996) que também estudou indivíduos saudáveis²². Um aumento gradual nos níveis plasmáticos de TM foi observado em pacientes anginosos e infartados, confirmando a existência de lesão endotelial nesses casos (Figura 2).

A análise da Figura 3 mostra que os níveis plasmáticos médios do FVIII se encontram elevados nos grupos de pacientes com IAM e angina de peito, quando comparados aos grupos controle e de indivíduos com fatores de risco. O aumento dos níveis do FVIII nos pacientes com IAM e angina pode ser correlacionado com o episódio da lesão ou ruptura da camada de células endoteliais sobre a placa aterosclerótica, o que resulta na liberação de TM e de FvW para o plasma. Tal afirmação é suportada pela correlação positiva e significativa encontrada entre os níveis de TM e de FVIII, uma vez que, a correlação de Pearson entre estes dois parâmetros obteve um coeficiente de correlação (r) de 0,44226 ($p=0,04$). No IAM e na angina de peito ocorre um processo de inflamação vascular resultando em um

aumento significativo nos níveis de FvW, uma vez que essa substância é considerada uma proteína de fase aguda²³. A expectativa de uma menor gravidade de alterações patológicas e sintomáticas nos anginosos em relação ao IAM seria consistente com o achado de níveis menos aumentados de FvW nesses pacientes²⁴.

No intuito de se avaliar a eficiência do mecanismo da anticoagulação natural em pacientes com IAM e angina de peito, foi realizada a determinação da atividade da PC. Pela análise dos resultados mostrados na Figura 4, pode-se verificar a existência de níveis significativamente menores de PCa nos grupos de pacientes com IAM e angina de peito, quando comparados aos grupos controle e dos indivíduos com fatores de risco. Este achado pode ser consequência da lesão endotelial que, com a ruptura da camada de células endoteliais, resultou na liberação da TM e do FvW para o plasma^{25,26,27}. Os níveis médios de PCa nos grupos controle e de indivíduos com fatores de risco foram semelhantes, sugerindo que os fatores de risco não exerceram influência significativa sobre a via da anticoagulação natural, representada pela proteína C. Além disso, os indivíduos com fatores de risco apresentaram níveis maiores de PCa e menores de FVIII quando comparados aos pacientes com infarto e com angina.

Foi observada uma correlação inversa e significativa ($r=-0,563$; $p=0,0043$) entre os níveis plasmáticos de TM e a PCa. A análise dessa correlação permite estabelecer o efeito da lesão endotelial sobre a competência funcional do sistema da anticoagulação natural, ou seja, a lesão endotelial consiste em uma alteração potencialmente capaz de comprometer o perfeito equilíbrio preexistente entre procoagulantes e anticoagulantes naturais. A PC para ser ativada e, subsequentemente, exercer adequadamente sua ação sobre os FVa e FVIIIa, depende da formação de complexos trombo-modulina-trombina, preferencialmente, ao nível das células endoteliais. Dessa forma, uma maior liberação de TM com menor atividade funcional para o plasma, resultante do dano do endotélio, levaria a uma menor ativação da PC e, consequentemente, a um aumento da disponibilidade no plasma dos FVa e FVIIIa, favorecendo a formação do trombo.

O achado de uma agregação plaquetária elevada nos pacientes com doenças cardiovasculares já era esperado, pois essas doenças são frequentemente associadas ao desenvolvimento de um trombo rico em plaquetas, sugerindo que, além da deposição de fibrina, a adesão e agregação plaquetárias são fatores envolvidos na fisiopatologia da doença cardíaca²⁸. Soma-se a isso o fato de que nos pacientes ocorreu o episódio de lesão ou ruptura da placa aterosclerótica o que, comprovadamente, contribui para o aumento de sua atividade. Foi observada também diferença significativa entre o grupo de indivíduos com fatores de risco em relação ao grupo controle, o que sugere uma maior atividade plaquetária naquele grupo (Figura 5). Davi *et al.* (1997) relataram o aumento persistente da atividade plaquetária em pacientes com desordens metabólicas associadas a um risco aumentado de complicações trombóticas incluindo a hipertensão arterial, o tabagis-

mo e a hipercolesterolemia¹⁵. Uma vez que, o grupo de indivíduos com fatores de risco apresentava dois ou mais fatores associados, é justificável o achado de uma atividade plaquetária exacerbada neste grupo quando comparada aos grupos de pacientes infartados e com angina de peito²⁹.

Uma comparação entre os resultados do teste de agregação plaquetária e os demais parâmetros permite inferir que o teste da agregação plaquetária tem grande aplicabilidade na detecção precoce de doenças cardiovasculares, antes que os sintomas se manifestem. É oportuno ressaltar que apenas os resultados deste teste apresentaram diferença significativa quando se compararam os grupos controle e dos indivíduos com fatores de risco. Isto equivale a dizer que nenhum outro parâmetro hemostático se alterou tão significativamente em indivíduos portadores de importantes fatores de risco, porém, ainda assintomáticos. Portanto, a ativação das plaquetas, avaliada pelo teste da agregação, parece ser resultado direto do efeito da hipertensão, do tabagismo e/ou de níveis elevados de colesterol, dentre outros fatores de risco.

Os níveis plasmáticos médios de fibrinogênio encontrados nos grupos controle e nos indivíduos com fatores de risco foram significativamente menores em relação aos níveis médios obtidos para os grupos dos pacientes com infarto e angina (Figura 6). Níveis plasmáticos elevados de fibrinogênio estão bem correlacionados com o diagnóstico das doenças cardiovasculares, notadamente, com o IAM e a angina de peito. Vários estudos epidemiológicos, iniciados com o *Northwick Park Heart Study*, têm confirmado a existência de uma associação expressiva e independente entre os níveis plasmáticos de fibrinogênio, o IAM e o derrame cerebral, em indivíduos aparentemente saudáveis³⁰. No entanto, sabe-se que o fibrinogênio é uma proteína de fase aguda e, dessa forma, o aumento de seus níveis pode ser reflexo da inflamação vascular associada com a aterosclerose³¹. Toss *et al.* (1997) relataram a importância dos níveis de fibrinogênio e da proteína C reativa, proteínas de fase aguda, na doença arterial coronariana instável³². Ambas as proteínas, e principalmente o fibrinogênio, correlacionaram-se com o risco aumentado de recorrência dessa doença. Esses autores propuseram também a determinação dos níveis de fibrinogênio como um parâmetro importante na definição do risco de incidência de doenças coronarianas futuras em indivíduos aparentemente saudáveis. Neste trabalho foi possível demonstrar uma tendência de aumento crescente da concentração de fibrinogênio nos grupos estudados, a saber, do grupo controle, para o de indivíduos com fatores de risco, deste para os pacientes com angina e, finalmente, destes para os pacientes com IAM.

A definição de um perfil hemostático sugestivo de fatores de risco para desenvolver infarto seria altamente desejável, considerando o valor potencial do mesmo para o diagnóstico precoce dessa grave doença, o que possibilitaria a adoção de medidas profiláticas. Uma comparação dos resultados dos parâmetros hemostáticos permite dizer que alterações dos componentes do

sistema da anticoagulação natural, traduzida pelo achado de uma correlação inversa e significativa ($r = -0,563$; $p = 0,0043$) entre os níveis plasmáticos de TM e de PCa (Tabela 4), assumem grande importância na definição desse perfil hemostático. Contribui ainda para a definição deste perfil o encontro de níveis elevados de FVIII e de fibrinogênio e também o aumento da agregação plaquetária, nos pacientes estudados, quando comparados aos controles. Portanto, os resultados encontrados suportam a relevância das alterações hemostáticas na fisiopatologia da angina e do IAM, considerando que a presença e a intensidade dessas alterações estão intimamente relacionadas com o agravamento da forma clínica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, procurou-se minimizar os efeitos dos descongelamentos e do tempo de estocagem das amostras de plasma utilizadas para a determinação dos parâmetros hemostáticos estudados. Assim, foram colhidas amostras de pacientes e de controles simultaneamente e essas foram mantidas sob as mesmas condições de armazenamento até o momento de serem utilizadas. Além do mais, todas as amostras de pacientes e de controles foram analisadas ao mesmo tempo e submetidas, rigorosamente, às mesmas condições técnicas.

Com o objetivo de minimizar a interferência da variável "idade" sobre os níveis plasmáticos dos parâmetros hemostáticos, o grupo controle foi constituído por indivíduos com idade pareada à dos pacientes. Dessa forma, os resultados obtidos com pacientes do grupo infarto, quando comparados aos controles, mostram diferenças significativas e confiáveis. A adoção das medidas acima possibilitou a obtenção de parâmetros hemostáticos fidedignos e, por consequência, a análise e interpretação desses resultados assume maior credibilidade.

CONCLUSÕES

- O encontro de níveis plasmáticos elevados de trombomodulina nos pacientes com angina de peito e com infarto agudo do miocárdio confirmaram a hipótese da existência de lesão endotelial, considerada ponto-chave no desencadeamento do processo trombótico;
- Os níveis de fator VIII se correlacionaram aos níveis de trombomodulina e, por consequência, estão correlacionados com a existência de lesão vascular;
- O achado de uma menor atividade da proteína C nos pacientes com angina de peito e com infarto agudo do miocárdio e sua correlação inversa obtida com a trombomodulina, permite inferir sobre a importância do comprometimento do sistema da anticoagulação natural na contribuição para o agravamento dessas doenças;
- A agregação plaquetária foi o único, dentre os parâmetros testados, que já se mostrou significativamente alterado no grupo dos indivíduos com fatores de risco quando comparado ao grupo controle. Tal achado sugere que o teste da agregação plaquetária possui grande potencialidade para detectar precocemente al-

terações no sistema hemostático que favorecem a formação de trombos, situação essa de grande importância clínica, principalmente, em indivíduos com fatores de risco para desenvolverem doenças coronarianas, porém, ainda assintomáticos.

- Os níveis plasmáticos de fibrinogênio mostraram-se elevados nos pacientes com angina de peito e infarto agudo do miocárdio, quando comparados aos outros grupos (controle e dos indivíduos com fatores de risco);

- O aumento gradativo da intensidade das alterações dos parâmetros hemostáticos nos diversos grupos estudados, tendo como referência os resultados do grupo controle, constituiu a base para se definir o elenco de exames que devem ser incluídos na rotina da avaliação laboratorial, visando conhecer o perfil hemostático de indivíduos e/ou pacientes que estão em risco de desenvolver um primeiro evento trombótico ou de recorrência desse. Uma análise criteriosa dos dados contidos nesse trabalho permitiu sugerir que a determinação dos níveis plasmáticos de trombosmodulina, de fator VIII, da proteína C ativada, de fibrinogênio e, principalmente, da agregação plaquetária possui grande importância para a avaliação do perfil hemostático na prevenção da doença trombótica.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da Universidade Federal de Minas Gerais, pelo apoio financeiro. Ao CNPq, pela concessão de bolsa de produtividade em pesquisa (processo nº 523462/95-6).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Oparil, S. Management of the hypertensive patient with coronary artery disease. *Am. J. Hypert.*, v. 12, n. 2, p. 56S - 62S, 1999.
2. Siscovich, D.S.; Schwartz, S.M.; Rosendaal, F.R.; Psaty, B.M. Thrombosis in the young: effect of atherosclerotic risk factors on the risk of myocardial infarction associated with prothrombotic factors. *Thromb. Haemost.*, v. 78, n. 1, p. 7 - 12, 1997.
3. Thogersen, A.M.; Jansson, J.H.; Boman, K.; Nilsson, T.K.; Weinehall, L.; Huhtasaari, F.; Hallmans, G. High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women. Evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor. *Circulation*, v. 98, p. 2241 - 2247, 1998.
4. Blann, A.D.; De Romeuf, C.; Mazurier, C.; McCollum, C.N. Circulating von Willebrand factor antigen II in atherosclerosis: a comparison with von Willebrand factor and soluble thrombosmodulin. *Blood Coag. Fibr.*, v. 9, p. 261 - 266, 1998.
5. Takahashi, H.; Ito, S.; Hanano, M.; Wada, K.; Niwano, H.; Seki, Y.; Shibata, A. Circulating thrombosmodulin as a novel endothelial cell marker: comparison of its behavior with von Willebrand factor and tissue-type plasminogen activator. *Am. J. Hem.*, v. 41, p. 32 - 39, 1992.
6. Conlan, M.G.; Folsom, A.R.; Finch, A.; Davis, C.E.; Sorlie, P.; Marcucci, G.; Wu, K.K. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex and risk factors for atherosclerosis. *Thromb. Haemost.*, v. 70, p. 380 - 385, 1993.
7. Rice, G.I.; Grant, P.J. FVIII coagulant activity and antigen in subjects with ischaemic heart disease. *Thromb. Haemost.*, v. 80, p. 757 - 762, 1998.
8. Kamphuisen, P.W.; Houwing-Duistermaat, J.J.; Van Houwelling, H.C.; Eikenboom, J.C.J.; Bertina, R.M.; Rosendaal, F.R. Familial clustering of factor VIII and von Willebrand factor levels. *Thromb. Haemost.*, p. 323 - 327, 1998.
9. Mohri, M.; Suzuki, M.; Sugimoto, E.; Sata, M.; Yamamoto, S.; Maruyama, I. Effects of recombinant human soluble thrombosmodulin (rhs-TM) on clot-induced coagulation in human plasma. *Thromb. Haemost.*, v. 80, p. 925 - 929, 1998.

10. Esmon, C.T. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science*, v. 235, p. 1348 - 1352, 1987.
11. Sadler, J.E. Thrombosmodulin structure and function. *Thromb. Haemost.*, v. 78, n. 1, p. 392 - 395, 1997.
12. Catalano, P.M. Coagulation regulation and hypercoagulable states. In: Besa, E. C.; Catalano, P. M.; Kant, J. A.; Jefferies, L. C. (Ed.) *Hematology*. Maryland: Williams & Wilkins, 1992. p. 241 - 256.
13. Meade, T. W.; Cooper, J. A.; Miller, G. J. Platelet counts and aggregation measures in the incidence of ischaemic heart disease (IHD). *Thromb. Haemost.*, p. 926 - 929, 1997.
14. Schenelder, D.J.; Tracy, P.B.; Mann, K.G.; Solei, B.E. Differential effects of anticoagulants on the activation of platelets *ex vivo*. *Circulation*, v. 96, p. 2877 - 2883, 1997.
15. Davi, G.; Gresele, P.; Violi, F.; Basili, S.; Catalano, M.; Giammarresi, C.; Volpato, R.; Nenci, G.G.; Ciabattini, G.; Patrono, C. Diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertension but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation *in vivo*. Evidence derived from the study of peripheral arterial disease. *Circulation*, v. 96, n. 1, p. 69 - 75, 1997.
16. Bröijersén, A.; Hamsten, A.; Eriksson, M.; Angelin, B.; Hjendahl, P. Platelet activity *in vivo* in hyperlipoproteinemia: importance of combined hyperlipidemia. *Thromb. Haemost.*, v. 79, p. 268 - 275, 1998.
17. Dockrell, M.E.C.; Walker, B.R.; Noon, J.P.; Watt, G.C.M.; Williams, B.C.; Webb, D.J. Platelet aggregation in young men with contrasting predisposition to high blood pressure. *Am. J. Hypert.*, v. 12, n. 2, p. 115 - 119, 1999.
18. Lowe, G.D.O.; Fowkes, F.G.R.; Dawes, J.; Donnan, P.T.; Lennie, S.E.; Housley, E. Blood viscosity, fibrinogen and activation of coagulation and leukocytes in peripheral arterial disease and the normal population in the Edinburgh artery study. *Circulation*, v. 87, p. 1915 - 1920, 1993.
19. Thompson, S.G.; Kienast, J.; Pyke, S.D.M.; Haverkate, F.; Van De Loo, J.C.W. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. *N. Engl. J. Med.*, v. 322, n. 10, p. 635 - 641, 1995.
20. Kohler, H.P.; Carter, A.M.; Stickland, M.H.; Grant, P.J. Levels of activated FXII in survivors of myocardial infarction - association with circulating risk factors and extent of coronary artery disease. *Thromb. Haemost.*, v. 79, p. 14 - 18, 1998.
21. Carvalho, M.G.; Silva, M.B.S. *Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação*. Belo Horizonte: [s.n.], 1988. p. 124.
22. Öhlin, A.K.; Morser, J.; Öhlin, H. Soluble thrombosmodulin antigen in plasma is increased in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Thromb. Res.*, v. 82, n. 4, p. 313 - 322, 1996.
23. O'Donnell, J.; Tuddenham, E.G.D.; Manning, R.; Kembal-Cook, G.; Johnson, D.; Laffan, M. High prevalence of elevated factor VIII levels in patients referred for thrombophilia screening: role of increased synthesis and relationship to the acute phase reaction. *Thromb. Haemost.*, v. 77, p. 825 - 828, 1997.
24. Andreoli, T.E.; Benett, J.C.; Carpenter, C.C.J.; Plum, F. *Cecil Medicina interna básica*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998, 965 p. Cap. 7: Cardiopatia coronariana, p. 52 - 66.
25. Blann, A.D.; Goode, G.K.; Miller, J.P.; McCollum, C.N. Soluble P-selectin in hyperlipidaemia with and without symptomatic vascular disease: relationship with von Willebrand factor. *Blood Coag. Fibr.*, v. 8, p. 200 - 204, 1997.
26. Folsom, A.R.; Wu, K.K.; Rosamond, W.D.; Sharret, A.R.; Chambless, L.E. Prospective study of hemostatic factors and incidence of coronary heart disease. *Circulation*, v. 96, p. 1102 - 1108, 1997.
27. Sumida, Y.; Wada, H.; Fujii, M.; Mori, Y.; Nakasaki, T.; Shimura, M.; Hiroyama, K.; Yano, Y.; Deguchi, K.; Shiku, H.; Adachi, Y. Increased soluble fibrin monomer and soluble thrombosmodulin levels in non-insulin-dependent Diabetes mellitus. *Blood Coag. Fibr.*, v. 8, p. 303 - 307, 1997.
28. Goto, S.; Sakai, H.; Goto, M.; Ono, M.; Ikeda, Y.; Handa, S.; Ruggeri, Z.M. Enhanced shear-induced platelet aggregation in acute myocardial infarction. *Circulation*, v. 99, p. 608 - 613, 1999.
29. Violi, F.; Criqui, M.; Longoni, A.; Castiglioni, C. Adep Group: relation between risk factors and cardiovascular complications in patients with peripheral vascular disease: results from the Adep Study. *Atheroscl.*, v. 120, p. 25 - 35, 1996.
30. Koenig, W. Hemostatic risk factors for cardiovascular diseases. *Eur. Heart J.*, v. 19, p. C39 - C43, 1998.
31. Scarabin, P.Y.; Aillaud, M.F.; Amouyel, P.; Evans, A.; Luc, G.; Ferrières, J.; Arveiler, D.; Juhan-Vague, I. Associations of fibrinogen, factor VII and PAI-1 with baseline findings among 10.500 male participants in a prospective study of myocardial infarction. *Thromb. Haemost.*, v. 80, p. 749 - 756, 1998.
32. Toss, H.; Lindahl, B.; Siegbahn, A.; Wallentin, L. Prognostic influence of increased fibrinogen and C-reactive protein levels in unstable coronary artery disease. *Circulation*, v. 96, n. 12, p. 4204 - 4210, 1997.

Endereço para correspondência

Profª Drª Maria das Graças Carvalho
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais
Av. Olegário Maciel, 2360, sala 608, Lourdes, Belo Horizonte, MG, 30180-112
Telephone: (0xx31) 339 - 7647. Fax: (0xx31) 339 - 7666
e-mail: pswanner@bhlinc.com.br

Meio CE e Glutaraldeído na preservação de plaquetas para o controle de qualidade em hematimetria*

CE medium and glutaraldehyde in platelets preservation for control quality in hematology

Fernanda Emendörfer¹; Lígia Maria Claro²; Samuel Ricardo Comar²;
Aguinaldo José do Nascimento³ & Maria Suely Soares Leonart⁴

RESUMO - Controles comerciais para todas as medidas hematológicas só se tornaram disponíveis no início da década de 60, sendo que ainda há falta de padronização apropriada para diversas medidas envolvendo componentes celulares. As amostras comerciais de células consistem de células de sangue humano ou de outros animais, alteradas para retardar a deterioração. De um modo geral, os fabricantes utilizam para essas células os termos: fixadas, tamponadas, estabilizadas ou preservadas, para indicar o seu processo de preparo, sem contudo descrevê-lo. Em trabalhos anteriores, desenvolveu-se amostras adequadas ao controle de qualidade em hematimetria, estáveis para os valores do eritrograma durante 100 dias, pela preservação de eritrócitos em meio CE, composto por glicose, NaCl, citrato de sódio, fosfato monohidrógeno de sódio, KCl, EDTA Na₂, albumina bovina, clormicetina, neomicina e cortisona e pela fixação parcial com glutaraldeído [Leonart, *Rev.Bras.Anál.Clín* 21:111, 1989]. O uso de soluções aditivas para o armazenamento de concentrados de plaquetas tem aumentado durante os últimos anos e se tornado freqüente na prática clínica. Em testes preliminares, realizados com o meio CE para a preservação de plaquetas humanas, observamos estabilidade para a sua contagem durante até 35 dias [Emendörfer *et al*, *Rev.Bras.Anál.Clín.* 31:18, 1999]. A partir de 20 amostras de sangue venoso em EDTA K₂ e da obtenção do plasma rico em plaquetas, testou-se a fixação parcial em glutaraldeído, com posterior ressuspensão das plaquetas em meio CE, obtendo-se valores estáveis para contagem em Coulter Counter T890 durante até 50 dias. Foram estudadas modificações na composição do meio CE nas concentrações de 1 a 6 g/dL de albumina bovina, obtendo-se maior estabilidade para as amostras de plaquetas preservadas na concentração de 6 g/dL, como empregada no meio CE original. No entanto, em amostras fixadas com glutaraldeído não se observou diferenças na contagem de plaquetas durante 50 dias, independentemente da concentração de albumina bovina. Os resultados obtidos sugerem que a fixação parcial com glutaraldeído pode ser adequada para a estabilização de plaquetas em amostras de controle de qualidade.

PALAVRAS-CHAVE - Plaquetas; preservação de plaquetas; controle de qualidade.

SUMMARY - Commercial control for blood cell values became available in the earlier sixties, but a lack of padronization for many measures involving cellular components still remains. Commercial cellular samples consist of human or animal blood components, altered for retarding degeneration. The names fixed, buffered, stabilized or preserved are commonly indicated without a clear description of the way they are processed. In previous works we developed samples that were adequate for quality control of red blood cell values for up to 100 days. The medium (CE medium) was composed of glucose, NaCl, sodium citrate, sodium monohydrogen phosphate, KCl, disodium EDTA, bovine serum albumin, chlormicetin, neomycin and cortisone plus red blood cells partially fixed with glutaraldehyde [Leonart *et al.*, *Rev.Bras.Anál.Clín.* 21:111, 1989]. During the last decade, the use of additives for storage of platelet concentrates became frequent in clinical practice. In preliminary tests with the use of CE medium for preservation of human platelet we observed stabilized samples for up to 35 days [Emendörfer *et al.*, *Rev.Bras.Anál.Clín.* 31:18, 1999]. In the present work we obtained a platelet rich plasma from 20 samples of venous blood in EDTA K₂, that was submitted to a partial fixation in glutaraldehyde followed by a resuspension in CE medium. It was observed stable values for platelet counts with the use of the Coulter Counter T890, during 50 days. In the absence of treatment with glutaraldehyde it was observed a better stability with the use of bovine serum albumin concentration of 6 g/dL in CE medium. Samples with partial fixation with glutaraldehyde remain stables for up to 50 days independently of the bovine serum albumin concentrations. The results obtained suggest that a partial fixation with glutaraldehyde can be adequate for platelet stabilization for use in quality control analysis.

KEY WORDS - Platelets; platelets preservation; quality control.

Recebido em 27/4/2000

Aprovado em 22/8/2000

Prêmio PNCQ/XXVII CBAC, Recife, PE, 2000

*Trabalho realizado no Laboratório de Citologia e Hematologia do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

¹Aluna de Iniciação Científica do Programa PIBIC - CNPq/UFPR, Curso de Farmácia da UFPR; ²Alunos do Curso de Pós-Graduação em Ciências Químico Farmacêuticas e da Saúde da UFPR;

³Professor Adjunto do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná; ⁴Professora Titular do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná;

INTRODUÇÃO

O controle de qualidade em laboratório repousa no estudo dos erros e na continuada tentativa de minimizá-los (Lewis & Koepcke, 1995). A nível mundial, à medida em que se implementa a garantia de qualidade, melhora o desempenho dos Laboratórios Clínicos e a qualidade em saúde da população. Apesar da existência de amostras para determinações hematimétricas, ainda há falta de padronização apropriada para diversas medidas envolvendo componentes celulares, devido à inexistência de materiais estáveis para uso de controles e padrões (Stiene-Martin *et al.*, 1998).

O estudo da morfologia, fisiologia, metabolismo, estrutura da membrana celular, e de alterações que ocorrem durante a preservação de eritrócitos e de plaquetas *in vitro*, permitiu o desenvolvimento de metodologias adequadas para o preparo de amostras estáveis para o controle de qualidade em hematimetria (Morgan *et al.*, 1978; Leonart *et al.*, 1989; Dacie & Lewis, 1995).

Em trabalhos anteriores, preparou-se amostras adequadas ao controle de qualidade em hematimetria, estáveis para os valores do eritrograma durante 100 dias, pela preservação de eritrócitos em meio CE com vitamina E, parcialmente fixados com glutaraldeído (Leonart *et al.*, 1989). Comprovou-se a validade do sistema através da utilização de tais amostras em um programa de qualidade externo, do qual participaram 20 laboratórios (Braga *et al.*, 1990).

O glutaraldeído, quando empregado em concentração e tempo adequados, forma produtos estáveis por ligações específicas entre as proteínas da membrana eritrocitária, com efeitos variáveis sobre as atividades biológicas, como a inibição da hemólise, redução da deformabilidade e manutenção da morfologia (Araki & Rifkind, 1981).

A plaqueta, o mais importante componente da hemostasia, é um fragmento citoplasmático com metabolismo aeróbico e anaeróbico ativos e com membrana plasmática semelhante à do eritrócito. A capacidade de adesividade e agregabilidade plaquetárias influenciam sobremaneira o seu comportamento, se preservadas em suspensão (Solberg, 1988; Stiene-Martin *et al.*, 1998).

Diversos autores indicam procedimentos para a preservação de plaquetas para uso transfusional, com subsídios importantes para a compreensão dos mecanismos relacionados à viabilidade das plaquetas e ao seu comportamento metabólico *in vitro* (Moroff *et al.*, 1982; Wong & Rock, 1982; Gottschall *et al.*, 1984; Kilkson *et al.*, 1984; Adams & Rock, 1988; George *et al.*, 1988; Solberg, 1988; Heaton *et al.*, 1990).

A preservação de plaquetas humanas viáveis para transfusão em meios de preservação e em bolsas plásticas adequadas, sob constante homogeneização a 22°C, é possível nos dias atuais, em períodos de até 5 a 7 dias (Dacie & Lewis, 1995).

Neste trabalho, pretendeu-se verificar a influência da fixação parcial com glutaraldeído em amostras de plasma rico em plaquetas suspensas em meio CE; bem

como a influência da concentração de albumina bovina no meio CE com ou sem glutaraldeído, com a finalidade de adequar amostras de plaquetas ao controle de qualidade em hematimetria.

MATERIAL E MÉTODOS

Preservação de plaquetas *in vitro*: Plaquetas humanas foram mantidas em meio CE (glicose 20 mM, cloreto de sódio 75 mM, citrato de sódio 40 mM, fosfato monohidrógeno de sódio 5 mM, cloreto de potássio 8 mM, EDTA Na₂ 1 mM, albumina bovina (SIGMA) 6 g/L, sulfato de neomicina 2 nM, succinato de cloromicetina 7 nM, cortisona 0,027 nM, pH 7,3±0,1 e 318±2 mOsm/Kg H₂O). (Leonart *et al.*, 1989). Testou-se variações na concentração albumina bovina em meio CE, de 1, 2 e 4g/L

• Coleta de material

Coletou-se 20ml de sangue venoso humano de 30 doadores considerados normais, de ambos os sexos, com idades entre 20 a 40 anos, após consentimento informado. O sangue foi fracionado em alíquotas de 5 mL em EDTA K₂ 1mg/ml.

• Preparo das amostras de plaquetas

O sangue foi centrifugado a 600 x g durante 15 minutos e o plasma rico em plaquetas foi dividido para o preparo das seguintes amostras, em condições de esterilidade:

- a) adição de meio CE na proporção 1:1;
- b) adição de uma solução de glutaraldeído em meio CE (1:250), recentemente preparada, na proporção 1:1;
- c) adição de meio CE com diferentes concentrações de albumina bovina na proporção 1:1;
- d) adição de uma solução de glutaraldeído e meio CE (1:250), recentemente preparada, com as diversas concentrações de albumina bovina testadas na proporção 1:1.

As amostras b e d foram, depois de adição da solução, homogeneizadas durante uma hora, com posterior centrifugação a 2260 x g por 10 minutos e ressuspensão do botão plaquetário no meio CE correspondente ao utilizado no preparo da solução com glutaraldeído.

• Preservação e análise das amostras

As amostras de suspensões de plaquetas foram preservadas a 4°C, em frascos de PVC, homogeneizadas semanalmente, e as plaquetas foram contadas em contador eletrônico de partículas Coulter Counter modelo T890, em intervalos periódicos. Foi aplicada análise de variância e cálculo do coeficiente angular da reta.

RESULTADOS

A Figura 1 mostra resultados para a preservação de plaquetas humanas em meio CE durante 35 dias. O coeficiente angular da reta foi calculado em - 0,59.

A preservação de plaquetas em meio CE após fixa-

FIGURA 1
Contagem de plaquetas humanas preservadas

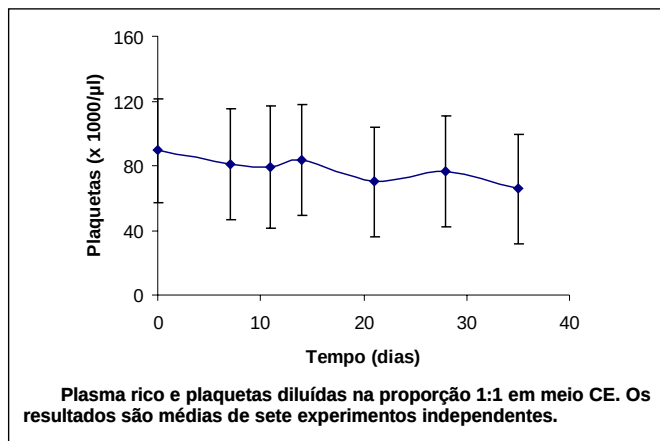
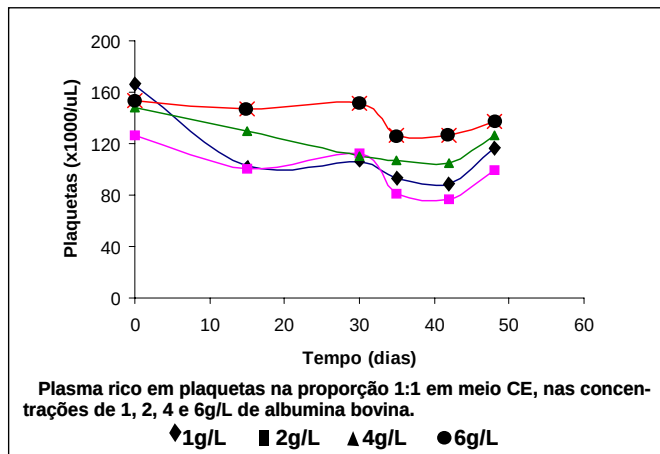


TABELA I
Valores médios, desvios padrão e coeficientes de variação para contagens de plaquetas em amostras preservadas em meio CE após fixação parcial com glutaraldeído, a partir de plasma rico em plaquetas.

dias	Média (x1000/mL)	dp	CV (%)	N
0	226,6	53,0	23,4	17
14	215,5	52,7	24,5	17
28	217,5	51,4	23,6	17
36	210,9	49,4	23,4	17
49	213,6	50,9	23,8	17

média = média aritmética; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; N = número de determinações.

FIGURA 3
Contagem de plaquetas humanas preservadas



ção parcial de glutaraldeído está ilustrada na Figura 2. Observou-se uma boa estabilidade na análise das plaquetas durante 50 dias. A análise estatística destes dados encontra-se nas Tabelas 1 e 2.

A avaliação das plaquetas durante a preservação em meio CE, em função da variação da concentração de albumina bovina, está ilustrada na Figura 3.

Observa-se estabilidade na contagem de plaquetas durante a preservação para amostras após fixa-

FIGURA 2
Contagem de plaquetas humanas preservadas

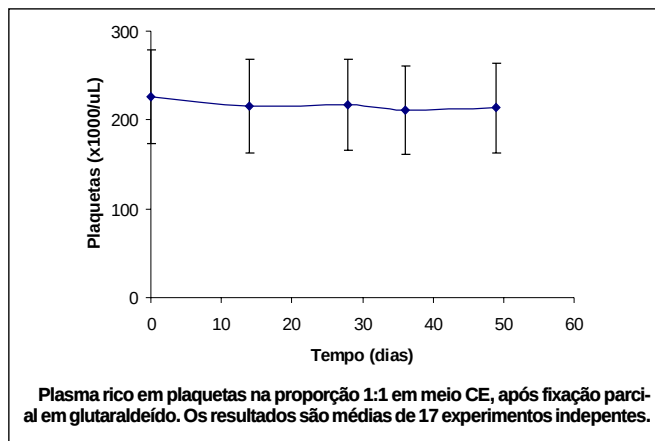
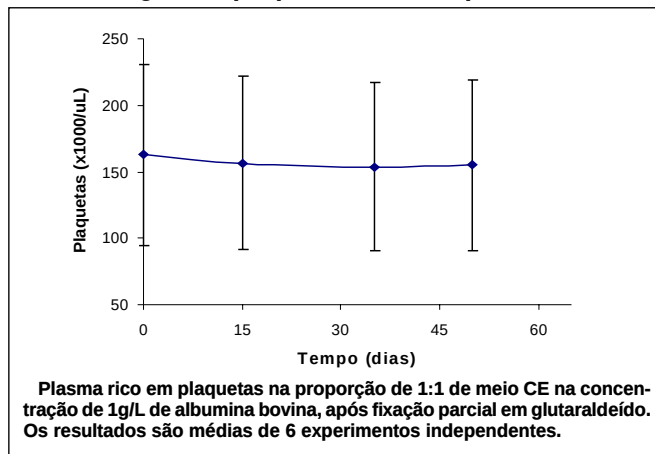


TABELA II
Análise da variância para a contagem de plaquetas em amostras preservadas em meio CE após fixação parcial com glutaraldeído, a partir de plasma rico em plaquetas.

Fonte da variação	SQ	GL	QM	F	p	Fcrítico
Dias	2457,8	4	614,5	0,232	0,920	2,486
Erro	212259,3	80	2653,2			
Total	214717,1	84				

Plasma rico em plaquetas na proporção de 1:1 em meio CE, após fixação parcial em glutaraldeído, em 17 experimentos independentes. SQ = soma dos quadrados dos resíduos; GL = grau de liberdade; QM = quadrado médio; F = teste de distribuição F; p = probabilidade.

FIGURA 4
Contagem de plaquetas humanas preservadas



ção parcial com glutaraldeído, encontram-se na Figura 4.

DISCUSSÃO

O emprego de amostras de calibração e amostras controle de valor conhecido para a verificação do desempenho de um instrumento ou processo analítico, segundo o Comitê Internacional de Padronização em

Hematologia, devem ser similares, nas suas propriedades, às amostras analisadas (Stiene-Martin *et al.*, 1998).

O meio CE de preservação foi desenvolvido com base nas propriedades fisiológicas do eritrócito, bem como em estudos sobre seu envelhecimento e preservação (Morgan *et al.*, 1978; Heaton *et al.*, 1981; Dacie & Lewis, 1995; Wolfe *et al.*, 1986; Clarck *et al.*, 1988).

A idéia de se empregar um mesmo meio de preservação para eritrócitos e plaquetas para hemoterapia tem apresentado bons resultados (Heaton *et al.*, 1990).

Ao se testar amostras de plasma rico em plaquetas com adição de meio CE, na proporção de 1:1, observou-se um decaimento lento e linear para a contagem de plaquetas em Coulter Counter T890, ao longo de 35 dias de preservação, com um coeficiente angular da reta de -0,59, obtido por regressão linear, o que demonstra que há um leve decaimento da contagem de plaquetas durante a preservação (Figura 1).

Para o aperfeiçoamento das amostras obtidas para o controle de qualidade da contagem de plaquetas, decidiu-se, com base em trabalhos anteriores com preservação de eritrócitos (Leonart *et al.*, 1989) e nos conhecimentos sobre a estrutura e metabolismo das plaquetas (Solberg, 1988; Stiene-Martin *et al.*, 1998), testar a fixação parcial com glutaraldeído. Obteve-se valores estáveis para o número de plaquetas ao longo de 50 dias de preservação (Figura 2). Os coeficientes de variação obtidos foram semelhantes entre os diferentes dias de contagem, com média de aproximadamente 23,7, que é aceitável, por se referir a concentrações de plaquetas de diferentes amostras (Tabela I). Verificou-se ainda, que não há diferença entre as médias obtidas nos diferentes dias de conservação de plaquetas, considerando-se $P > 0,05$ (Tabela II).

Com a finalidade de melhorar a preservação de plaquetas, e mesmo de simplificar a fórmula original do meio, testou-se também alterações na concentração de albumina bovina do meio CE, para 1, 2 e 4g/L (Emendörfer *et al.*, 1999a). A análise dos resultados mostrou maior estabilidade para as amostras de plaquetas preservadas na concentração original de 6 g/L de albumina bovina (Figura 3).

A análise de amostras de plaquetas em meio CE com variações na concentração de albumina bovina, após fixação parcial de glutaraldeído, foi realizada com base nas propriedades deste último em relação à estabilidade da membrana plasmática de eritrócitos.

Na preservação de plaquetas, os resultados apresentaram diferenças significativas para as diversas concentrações de albumina bovina utilizadas, sendo que se observa um declínio mais rápido para o número de plaquetas contadas em amostras com 1, 2 e 4g/L de albumina bovina (Figura 3).

Para as amostras de plaquetas com fixação parcial de glutaraldeído não foram observadas diferen-

ças significativas entre as diversas concentrações de albumina bovina empregadas para as contagens das amostras em Coulter Counter T890. Estes resultados diferem dos anteriores, sem fixação parcial de glutaraldeído, e mostram que concentrações mais baixas de albumina bovina podem ser utilizadas, desde que as plaquetas sejam fixadas parcialmente com glutaraldeído (Figura 4).

Os resultados obtidos sugerem que a fixação parcial com glutaraldeído pode ser adequada para a estabilização de plaquetas em amostras de controle de qualidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adams, G. A.; Rock, G.. Storage of human platelet concentrates in an artificial medium without dextrose. *Transfusion*, Philadelphia; London, v.28, p.217-220, 1988.
2. Araki, K.; Rifkind, J. M.. The rate of osmotic hemolysis. A relationship with membrane bilayer fluidity. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam: v. 645, p. 81 - 90, 1981.
3. Braga, A. L.; Tutake, E. M.; Nascimento, A. L.; Pelissari, C. B.; Stinghen, S. T.; Malvezzi, M.; Duarte, L. C.; Leonart, M. S. S.. Controle de qualidade externo do eritrograma: uma experiência em laboratórios de análises clínicas do estado do Paraná. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.22(4), p.93-96, 1990.
4. Clarck, M. R.; Shohet, S. B.. Red cell senescence. *Clinical Haematology*, London, v.14, p.223-257, 1988.
5. Dacie, J. V.; Lewis, S. M.. *Practical Haematology*, Edinburg, Churchill Livingstone, 6th edition, London, 1995.
6. Emendörfer, F.; Claro, L. M.; Comar, S. R.; Carvalho, E. G.; Nascimento, A. J.; Leonart, M. S. S.. Estudo de alternativas para a adição da fração plaquetária em amostras para controle de qualidade de determinações hematimétricas. *Anais do 7º Evento de Iniciação Científica do Paraná*, Curitiba, v.1, p.186, 1999a.
7. Emendörfer, F.; Claro, L. M.; Comar, S. R.; Carvalho, E. G.; Nascimento, A. J.; Leonart, M. S. S.. Estudo de alternativas para a adição da fração plaquetária em amostras para controle de qualidade de determinações hematimétricas. *Anais do 7º Evento de Iniciação Científica do Paraná*, Curitiba, v.1, p.186, 1999b.
8. George, J. N.; Pickett, E. B.; Heinz, R.. Platelet membrane glycoprotein changes during the preparation and storage of platelet concentrates. *Transfusion*, Philadelphia, v.28, p.123-126, 1988.
9. Gottschall, J. L.; Johnston, V. L.; Rzad, L.; Anderson, A. J.; Aster, R. H.. Importance of white blood cells in platelet storage. *Vox Sangüinis*, v.47, p.101-107, 1984.
10. Heaton, A.; Miripol, J.; Grapka, B.; Dehart, D.; Seeger, C.; Rzad, L.; Aster, R.. Improved storage of high hematocrit cell concentrates using a manitol, adenine, saline, glucose solution. *Transfusion*, Philadelphia, v.21, p.600-601, 1981.
11. Heaton, W. A. L.; Holme, S.; Keegan, T.. Development of a combined storage medium for 7-day storage of platelet concentrates and 42-day storage of red cell concentrates. *British Journal of Haematology*, Oxford, v.75, p.400-407, 1990.
12. Kilkson, H.; Holme, S.; Murphy, S.. Platelet metabolism during storage of platelet concentrates at 22°C. *Blood*, v.64, p.406-414, 1984.
13. Leonart, M. S. S.; Sliva, E. L.; Stinghen, S. T.; Nascimento, A. J.. Amostra para controle de qualidade do eritrograma durante 100 dias. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, Rio de Janeiro, v.21, p.111-113, 1989.
14. Lewis, S. M.; Koepke, A. J.. *Hematology Laboratory Management and Practice*, Butterworth Heinemann, London, 1995.
15. Morgan, L. O.; Jones, W. G.; Fisher, J. O.; Cauvil, T.. A whole control for the Coulter models. *Journal Clinical Pathology*, London, v.31, p.50-53, 1978.
16. Moroff, G.; Friedman, A.; Robkin-Kline, L.. Factors influencing changes in pH during storage of platelet concentrates at 20-24°C. *Vox Sangüinis*, v.42, p.33-45, 1982.
17. Solberg, C.. Storage of human red blood cells and platelets. *Upsala Journal Medical Science*, v.93, p.201-214, 1988.
18. Stiene-Martin, E. A.; Lotspeich-Steininger, C. A.; Koepcke, J. A. *et al.* *Clinical Hematology-Principles, Procedures, Correlations*, Lippincott, New York, 2nd ed., 1998, 817p.
19. Wolfe, L. C.; Byrne, A. M.; Lux, S. E.. Molecular defect in the membrane skeleton of blood bank storage red cells. *Journal Clinical Investigation*, New York, v.78, p.1681-1686, 1986.
20. Wong, S. C.; Rock, G.. The effect of adenine on platelet storage. *Transfusion*, Philadelphia, v.22, p.283-287, 1982.

Otimização da técnica de RT-PCR para avaliação da expressão gênica do receptor da LDL em células mononucleares periféricas de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com medicamentos hipolipemiantes*

Optimized RT-PCR assay to evaluate LDL receptor mRNA levels in peripheral mononuclear cells from hypercholesterolemic individuals treated with lipid-lowering drugs

Luis Salazar Navarrete, Mário Hiroyuki Hirata & Rosário Dominguez Crespo Hirata

RESUMO - Foi otimizado o método de RT-PCR para avaliar a expressão gênica do receptor da LDL (RLDL) em células mononucleares periféricas (CMP), provenientes de indivíduos hipercolesterolêmicos tratados com agentes hipolipemiantes. As CMP foram isoladas a partir de 10 mL de sangue periférico por centrifugação sob gradiente de Ficoll-Paque® Plus. O RNA total foi extraído utilizando o reagente Trizol®, ressuspendido em água tratada com DEPC e quantificado por espectrofotometria a 260 nm. O cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA utilizando a enzima SuperScript™ II RT RNase-. A seguir, o gene do RLDL foi amplificado pela técnica de PCR. Os produtos de amplificação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% e fotografados. Os genes da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e da β-actina foram amplificados como controles internos utilizando a mesma metodologia descrita. A expressão gênica do RLDL foi determinada pelas relações entre a intensidade das bandas dos produtos amplificados do RLDL e GAPDH (RLDL/GAPDH) e do RLDL e β-actina (RLDL/β-actina), determinadas por densitometria das fotografias. Em resumo, o método otimizado permite a rápida avaliação da expressão gênica do RLDL em CMP, sem a necessidade de componentes radioativos.

PALAVRAS-CHAVE - Receptor da LDL; RT-PCR; expressão gênica; hipercolesterolemia

SUMMARY - We have optimized a RT-PCR method to evaluate LDL receptor (LDLR) gene expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from hypercholesterolemic patients treated with lipid-lowering drugs. EDTA-anticoagulated samples were used for PBMC isolation by Ficoll-Paque® gradient procedure, and total RNA was extracted using Trizol® Reagent. RNA was resuspended in DEPC-treated water and quantified by spectrophotometry at 260 nm. cDNA was produced from 1 µg of total RNA by reverse transcription (RT) using the SuperScript™ II RT RNase-. cDNA encoding LDLR gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR). Number of cycles and reagent concentrations were set up for providing high sensitivity and reproducibility of the PCR amplifications. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide. The intensity of the bands was evaluated by scanning densitometry from negative films (Polaroid system). The efficiency of RNA extraction and cDNA synthesis were controlled by amplification of the housekeeping genes glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase (GAPDH) and b-actin using the same methodology. In summary, the procedure here described allows a rapid determination and quantitation of mRNA for the LDLR, without handling radioactive compounds or time-consuming blotting and detection procedures.

KEY WORDS - LDL receptor; RT-PCR; gene expression; hypercholesterolemia

INTRODUÇÃO

O receptor da lipoproteína de baixa densidade (RLDL) desempenha uma importante função na homeostase do colesterol, ele faz parte do mecanismo de remoção das lipoproteínas do plasma e fornecimento do colesterol e triglicerídeos para as células. Por isso,

o RLDL é responsável pela manutenção da homeostase dos lipídeos e das lipoproteínas no plasma e nos tecidos e, ao mesmo tempo, protege as células do acúmulo desses lipídeos, principalmente do colesterol¹².

A regulação in vivo do RLDL na célula hepática tem sido o foco de interesse em várias pesquisas^{1,10,11, 18}. Entretanto, esses estudos tem-se visto descontinuados

Recebido em 19/4/2000

Aprovado em 21/8/2000

*Prêmio DOLES • XXVII CBAC, Recife, PE, 2000

pela dificuldade da obtenção de amostras de fígado em humanos. Uma fonte mais acessível de células, expostas as mesmas condições externas que os hepatócitos, são as células mononucleares periféricas (CMP). Considerando que os mecanismos regulatórios básicos nas CMP e hepatócitos são similares¹³, a expressão do RLDL nas CMP pode refletir a sua expressão no fígado.

Vários métodos tem sido desenvolvidos para a detecção e quantificação de RNA em diferentes amostras. Dentre eles, podemos mencionar a técnica de Northern blot, a hibridização *in situ* e a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR), apresentando cada uma delas diversas vantagens¹². Atualmente, o método de RT-PCR é o mais utilizado para a detecção e quantificação de expressão gênica, diagnóstico de agentes infecciosos, detecção de oncogenes ou gerar cDNA para clonagem, devido a sua alta sensibilidade e menor tempo de ensaio^{12,16}.

Com base nas informações apresentadas, o presente trabalho tem por objetivo a otimização do método de RT-PCR para avaliar a expressão gênica do RLDL em CMP de pacientes hipercolesterolêmicos tratados com agentes hipolipemiantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Amostragem

Foram colhidas amostras de sangue total, após jejum de 12 horas utilizando o sistema de coleta a vácuo, em tubos contendo EDTA como anticoagulante (1 mg/ml sangue) de 20 indivíduos portadores de hipercolesterolemia primária, classificados de acordo com os critérios do 2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias⁴, tratados durante 4 semanas com o medicamento hipocolesterolêmico Atorvastatina.

2. Avaliação da expressão gênica do RLDL em células mononucleares periféricas

2.1. Obtenção das células mononucleares periféricas

As células mononucleares periféricas (CMP) foram isoladas por centrifugação sob um gradiente de densidade em solução de Ficoll-Paque® Plus (Pharmacia Biotech)⁶, a partir de 10 mL de sangue total. As amostras de sangue total foram centrifugadas a 400 x g por 10 min. a temperatura ambiente (TA), e o plasma rico em plaquetas foi removido e descartado. A seguir, o volume sanguíneo foi reconstituído e diluído a 1:2 com tampão TE, pH 7,4 (Tris-HCl a 10 mM, pH 7,4 e EDTA a 5mM, pH 8,0). Essa suspensão de células foi adicionada vagarosamente sobre uma solução de Ficoll-Paque® Plus (d = 1,070 g/ml) e centrifugada a 400 x g, por 30 min., a TA. A camada de células mononucleares foi recuperada após 2 lavagens com tampão TE. As células assim obtidas, foram contadas após coloração vital com azul de Tripán e utilizadas imediatamente para a extração do RNA total.

2.2. Extração do RNA total

O RNA total foi extraído a partir da suspensão de CMP (1 x 10⁶ células/mL), que foram lisadas utilizando-se 1 mL do reagente TRIZOL® (Gibco BRL), baseado no método de Chomczynsky & Sacchi³. De acordo com o protocolo do fabricante, as amostras foram homogeneizadas, seguidas da adição de 0,2 mL de clorofórmio, homogeneização e centrifugação a 12.000 x g, por 15 min., a 4°C. O RNA total presente na fase aquosa foi precipitado com 0,5 mL de isopropanol gelado, centrifugado a 12.000 x g, por 10 min., 4°C e lavado com etanol 75% (v/v). A seguir, o RNA foi seco ao ar e ressuspenso em 50 mL de água estéril tratada com dietilpirocabonato (DPEC) e incubado por 10 min. a 56°C e armazenado a -70°C para posterior análise.

2.3. Avaliação eletroforética e quantificação do RNA total

A integridade das moléculas de RNA foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1,0% contendo 0,5 mg/mL de brometo de etídeo, em tampão TPE (Tris-fosfato a 0,9 mM e EDTA a 2,0 mM, pH 8,0). A separação eletroforética foi realizada a 100 V por 30 min. e a visualização das bandas foi feita em transiluminador sob luz UV¹⁵.

O RNA total isolado foi também quantificado por espectrofotometria a 260 nm, utilizando o espectrofotômetro UV Beckman DU 640, após diluição das amostras 1:100 em água estéril tratada com DEPC¹⁵.

2.4. Síntese do cDNA

A síntese do cDNA a partir do RNA total obtido, foi realizada utilizando-se a enzima SuperScript™ II RT RNase H- (Gibco BRL), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Desta forma, a solução de RNA total foi submetida a desnaturação por 5 minutos a 96°C e imediatamente transferida para banho de gelo. A seguir, em tubo de microcentrífuga de 0,5 mL pipetou-se, 2 µL (200 ng) de oligonucleotídeos aleatórios (*random primers*), o volume da solução de RNA previamente desnaturado equivalente a 1 µg de RNA e completou-se com água estéril para 12 µL. Os tubos foram homogeneizados, brevemente centrifugados e submetidos a 70°C por 10 minutos para desnaturação do RNA e em seguida, resfriada em banho de gelo. Centrifugou-se brevemente e acrescentou-se a seguinte mistura de reagentes: tampão da enzima RT 5X concentrado (Tris-HCl a 250 mM, KCl a 375 mM e MgCl₂ a 15mM), DTT a 100 mM, dNTP a 10 mM e 200 U da enzima RT. Essa mistura final foi submetida por 10 min. a 25°C para permitir a hibridação dos oligonucleotídeos aleatórios ao RNA, seguida de 50 min. a 42°C para ação da enzima RT e 15 min. a 70°C para extensão final das cadeias de cDNA sintetizadas. O cDNA assim obtido foi armazenado a -20°C até a realização da PCR.

2.5. Amplificação do cDNA pela PCR

A reação de amplificação do cDNA foi composta de tampão de PCR (Tris-HCl a 75 mM, pH 9,0; KCl a 50

mM; MgCl₂ a 2,0 mM e (NH₄)₂SO₄ a 20 mM), 0,2 mM de cada nucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 100 nM de cada iniciador e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (Biotools, Espanha), adicionados a microtubos de 0,5 mL. Em seguida, foram pipetadas as amostras, 2µL de cDNA para RL DL e 2µL de cDNA para GAPDH ou β-actina, e o volume completado para 50µL com água estéril. Os tubos com os reagentes foram homogeneizados e colocados no termociclo automatizado PTC-100 MJ Research, Inc. (Lab. Trade do Brasil) programado da seguinte forma: desnaturação inicial (*hot start*): 98°C por 3 minutos; amplificação: 35 ciclos de 95°C por 1 minuto (desnaturação); 55°C por 1 minuto (hibridação) e 72°C por 1 minuto (extensão) e extensão final: 72°C por 10 minutos. Ao final dos ciclos a reação foi interrompida por esfriamento a 4°C.

Os iniciadores para a amplificação do gene do RL DL foram escolhidos de acordo com o trabalho de Powell & Kroon¹³. Para a amplificação dos genes housekeeping (constitutivos), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e β-actina, os iniciadores foram escolhidos de acordo com o trabalho de Tokunaga *et al.*¹⁷ e Ishimura *et al.*⁹, respectivamente.

2.6. Avaliação eletroforética dos produtos de amplificação

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídeo (0,5µg/mL), adicionando-se 3µL de tampão de amostra (azul de bromofenol a 0,25%, xilenocianol-FF a 0,25% e glicerol a 30%) a 10µL de produto de PCR, aplicando-se no gel e submetendo-se a eletroforese em tampão TBE (Tris-HCl a 0,45 mM, ácido bórico a 0,45 mM e EDTA a 2,5 mM, pH 8,0) por 30 min. a 100 V. A visualização das bandas foi feita em transiluminador sob luz UV, utilizando-se como referência um marcador de tamanho molecular de 100 bp.

2.7. Medida semiquantitativa da expressão gênica do RL DL

Ao final da separação eletroforética foi realizada a fotodocumentação do gel com câmara fotográfica Polaroid, e as fotos e/ou negativos foram submetidos a análise densitométrica utilizando o densitômetro GS 700 da Bio-Rad, EUA. As leituras de densidade óptica (reflectância) das bandas foram determinadas pelo programa para Análise de imagens: Molecular Analyst TM/PC (Windows Software for Bio-Rad's Image Analysis Systems, versão 4.1).

As amplificações dos genes housekeeping GAPDH e β-actina foram utilizadas para o cálculo da expressão relativa, pelo fato dos referidos genes serem expressos de forma constante e abundante nas células de mamíferos⁵. A medida da expressão do mRNA do RL DL foi obtida em valores relativos (expressão relativa) entre a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação do RL DL e a densidade óptica da banda correspondente ao produto de amplificação da GAPDH ou β-actina.

2.8. Controle de qualidade das técnicas de RT e PCR

A amplificação concomitante da GAPDH ou β-actina, foi utilizada também como controle interno de todo o procedimento. Além disso, as amplificações realizadas pela técnica de PCR, foram monitoradas utilizando-se controle de reagentes (tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto o ácido nucléico) em cada conjunto de reações. Também foram repetidas 10% das reações de RT-PCR, aleatoriamente.

2.9. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa SigmaStat para Windows, versão 1,0. Os testes de Correlação linear e de Wilcoxon foram utilizados para a comparação dos valores relativos de expressão gênica do RL DL, obtidos pelas relações RL DL/GAPDH e RL DL/β-actina. O nível de significância considerado foi de 5%¹⁴.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de evitar ao máximo as variações intra e inter-ensaio, procurou-se estabelecer as mesmas condições de reação para os três genes (RL DL, GAPDH e β-actina). As condições de PCR foram determinadas com base no trabalho de Powell & Kroon¹³ e nas temperaturas de desnaturação dos diferentes iniciadores. As condições avaliadas foram: a quantidade de RNA necessário para amplificação do cDNA, a concentração dos iniciadores, a concentração de cloreto de magnésio, o número de ciclos da PCR, a amplificação conjunta do RL DL e gene housekeeping (PCR-duplex) e o uso de diferentes genes housekeeping na avaliação da expressão do RL DL.

Para a otimização da RT-PCR, inicialmente variou-se a quantidade de RNA utilizado para a síntese do cDNA, mantendo-se as concentrações dos demais reagentes da RT e PCR constantes. Na Fig. 1, são mostrados os produtos de amplificação dos genes da GAPDH e RL DL, amplificados a partir de 1, 2, e 3µg de RNA total. Como é possível notar os produtos de PCR gerados a partir das três concentrações de RNA total puderam ser detectados com a mesma eficiência. Assim, foi estabelecida a utilização de 1µg de RNA total para síntese do cDNA, considerando que o RNA total é isolado em pequena quantidade das CMP.

A influência da concentração de iniciadores na eficiência da PCR foi também investigada. Com esse objetivo foram testadas concentrações de 100, 150, 200, 250 e 300 nM de cada iniciador na amplificação dos genes do RL DL e da GAPDH. Os produtos de PCR são mostrados na Fig. 2. Podemos observar que houve amplificação eficiente para ambos os genes entre as concentrações de 100 a 300 nM, coincidentes com a literatura⁸. Estabeleceu-se o uso da menor concentração investigada (100 nM), com o objetivo de evitar a forma-

ção de produtos inespecíficos, como primer-dimers, que podem competir com o DNA genômico pela enzima DNA polimerase, resultando em baixa eficiência da PCR⁸.

A concentração de cloreto de magnésio na PCR pode afetar a hibridação dos iniciadores, temperatura de dissociação das fitas, formação de artefatos (primer-dimers), atividade e fidelidade da enzima DNA polimerase⁸. Pela importância deste componente na reação, avaliou-se o efeito de diferentes concentrações de $MgCl_2$ na eficiência de amplificação. Foram testadas as concentrações de 2, 3, 4, 5 e 6 mM, na amplificação dos genes da GAPDH e do RLDL. Na Fig. 3, pode-se observar que o melhor resultado na amplificação do gene do RLDL foi obtido com a concentração de 2 mM, concentração já incluída no tampão de PCR da DNA polimerase utilizada. Essa concentração de $MgCl_2$ é considerada ideal também por outros autores⁸. Resultado similar foi obtido na amplificação do gene da GAPDH (dado não mostrado).

Na Fig. 4 são mostrados os produtos de amplificação dos genes da GAPDH e do RLDL, utilizando 25, 30, 35, 40, 45 ciclos na reação de amplificação. Podemos observar que a partir de 35 ciclos se consegue uma boa eficiência de amplificação para os dois genes em questão. Também podemos mencionar que a partir de 40 ciclos se consegue o ponto de saturação da PCR, para os dois genes, atingindo-se o platô da reação, o qual não deve ser utilizado nos estudos de expressão gênica, já que em essas condições, não seria possível avaliar alterações da expressão do gene investigado. Em condições de platô, a expressão do gene investigado se apresentaria abundante e similar ao gene housekeeping, com o qual variações de expressão do gene investigado não poderiam ser detectadas⁷. O estabelecimento do número de ciclos evita também a amplificação de produtos inespecíficos, que pode ocorrer quando o número é excessivo, por outro lado, o uso de um número reduzido de ciclos pode resultar na obtenção de uma baixa quantidade de produto amplificado⁸.

Com o objetivo de realizar a amplificação num mesmo tubo do gene housekeeping e do gene a ser investigado, foram realizados testes utilizando GAPDH e RLDL em conjunto. Esse caso é particularmente interessante para avaliação da expressão do gene do RLDL, devido ao tamanho do fragmento obtido (258 bp) ser o suficientemente diferente do gene da GAPDH (452 bp), podendo ser avaliados conjuntamente no gel de agarose, como pode ser observado na Fig. 5A. Outra vantagem dessa metodologia, seria a eliminação da variação interensaio. A amplificação concomitante de genes *housekeeping* na RT-PCR, permite corrigir variações na extração do RNA, síntese do cDNA e amplificação. Além disso, permite a quantificação do mRNA do gene de interesse, o qual é obtido através da relação de densi-

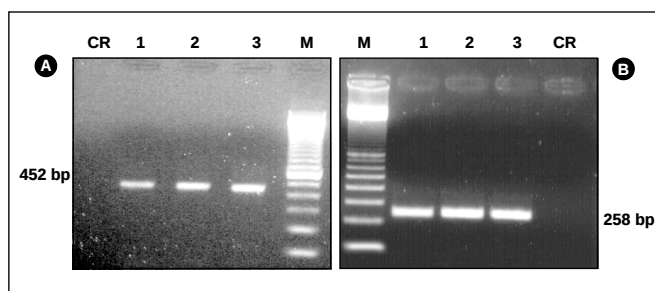


Figura 1- Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR dos genes da GAPDH (A) e do RLDL (B) gerados a partir de cDNA sintetizado com 1, 2 e 3 µg de RNA total (linhas 1-3). M, marcador de tamanho molecular de DNA (100 bp) e CR, controle de reagentes.

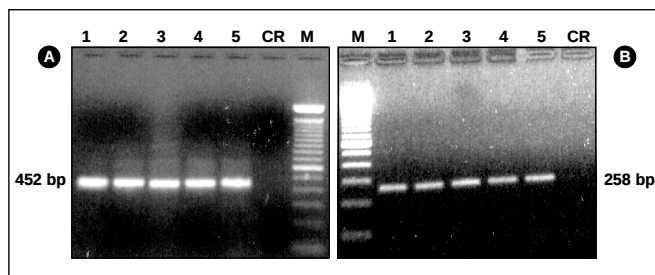


Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR dos genes da GAPDH (A) e do RLDL (B) amplificados utilizando concentrações de iniciadores de 100, 150, 200, 250 e 300 nM (linhas 1-5). M, marcador de tamanho molecular de DNA (100 bp) e CR, controle de reagentes.

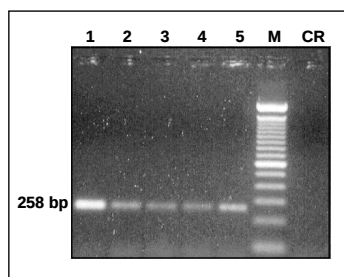


Figura 3 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR do gene do RLDL amplificados utilizando concentrações de $MgCl_2$ de 2, 3, 4, 5 e 6 mM (linhas 1-5). M, marcador de tamanho molecular de DNA (100 bp) e CR, controle de reagentes.

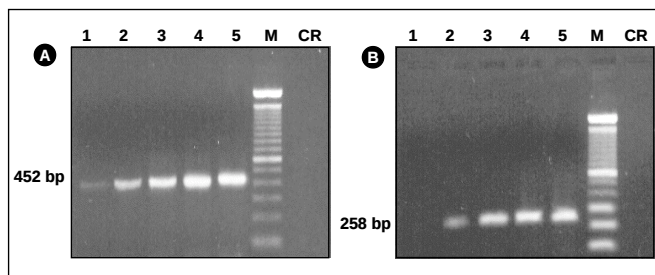


Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR dos genes da GAPDH (A) e do RLDL (B) amplificados utilizando 25, 30, 35, 40 e 45 ciclos (linhas 1-5). M, marcador de tamanho molecular de DNA (100 bp) e CR, controle de reagentes.

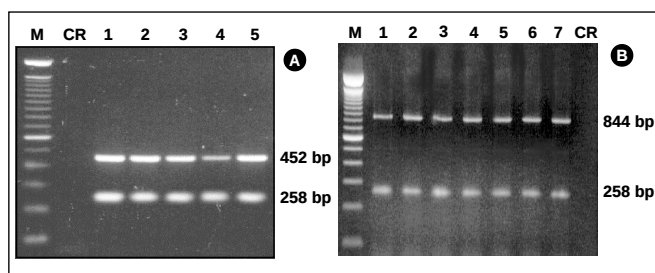


Figura 5 - Eletroforese em gel de agarose a 1,5% dos produtos de PCR - duplex dos genes da GAPDH (452 bp) e do RLDL (258 bp) (A) e β -actina (844 bp) e RLDL (258 bp) (B). M, marcador de tamanho molecular de DNA (100 bp) e CR, controle de reagentes.

Expressão gênica do RLDL (Unidades arbitrárias)

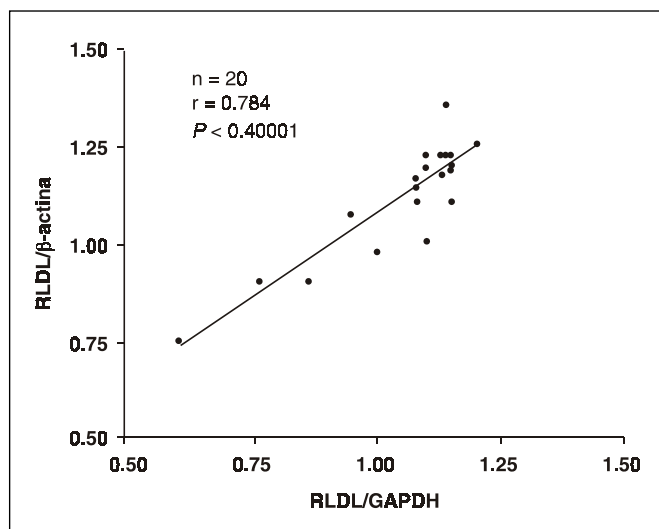


Figura 6 - Gráfico de regressão linear dos valores relativos de expressão gênica do RLDL em CMP obtidos pela relação RLDL/GAPDH (x) e RLDL/ β -actina (y) de 20 pacientes hipercolesterolêmicos por PCR-duplex.

dade óptica entre o sinal do mRNA do gene investigado e o sinal do mRNA do gene *housekeeping*.

Existem vários genes *housekeeping* que podem ser usados como controles na técnica de RT-PCR, os mais comumente utilizados são: GAPDH, β -actina e β -globina⁵. Com o objetivo de verificar se o uso de diferentes genes *housekeeping* na RT-PCR pode modificar os valores relativos de expressão observados para um determinado gene, foram comparados os valores de expressão gênica do RLDL obtidos por PCR-duplex das relações RLDL/GAPDH e RLDL/ β -actina. Como pode ser observado na Figura 6, os valores relativos de expressão gênica obtidos por ambos sistemas apresentaram correlação positiva e significativa ($r = 0,784$, $P < 0,0001$). Entretanto, quando comparados os valores medianos de expressão do gene do RLDL obtidos mediante ambas as relações, podemos observar que os valores de expressão, determinados pela relação RLDL/ β -actina, são mais elevados que os obtidos pelo uso da relação RLDL/GAPDH (1,16 vs. 1,08; $P < 0,05$). Esse comportamento pode ser explicado, porque na amplificação conjunta do RLDL e da β -actina é favorecida a amplificação do fragmento de menor tamanho (258 bp) correspondente ao gene do RLDL (Fig. 5B), quando comparado à β -actina (844 bp). Considerando esses achados, optamos pela utilização do gene da GAPDH (452 bp), quando avaliada a expressão gênica do RLDL por PCR-duplex.

Em resumo, o método otimizado permite a rápida avaliação da expressão gênica do RLDL em CMP, sem a necessidade de componentes radioativos. Além disso, a quantificação da expressão gênica do RLDL em CMP, pode ser uma ferramenta importante na avaliação de pacientes hipercolesterolêmicos que não respondem ao tratamento com agentes hipolipemiantes.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem, em especial, a colaboração de Hamilton M. Hinuy e o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Também agradecem o apoio da CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Luis A. Salazar é Bolsista de Doutorado da FAPESP (Proc. 98/09759-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bergstrom, J.D.; Bostedor, R.G.; Rew, D.J.; Geissler, W.N.; Wright, S.D. & Chao, Y.S. Hepatic responses to inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase: a comparison of atorvastatin and simvastatin. *Biochim. Biophys. Acta.* 1389: 213-221, 1998.
2. Brown, M.S. & Goldstein, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science.* 232:34-47, 1986.
3. Chomczynsky, P. & Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
4. Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias: avaliação, detecção e tratamento. (2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias, São Roque, 1996). *Arq. Bras. Cardiol.* 67:109-128, 1996.
5. Denis, M.G. & Lustenberg P. Qualitative low-level internal control for Nested RT-PCR. *BioTechniques.* 19: 906-908, 1995.
6. Fortino, M.; Merson, E.J. & Allen, F.H. Micromethod for rapid separation of lymphocytes from peripheral blood. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 1: 131-133, 1971.
7. Huang, Z.; Fasco, M. & Kaminsky, L. Optimization of DNase I removal of contaminating DNA from RNA for use in quantitative RNA-PCR. *BioTechniques.* 20:1012-1020, 1996.
8. Innis, M.A. & Gelfand, D.H. Optimizations of PCRs. In: Innis, M.A.; Gelfand, D.H.; Sninsky, J.J. & White, T.J. *PCR protocols: a guide to methods and applications.* New York: Academic Press, 1990, p. 3-12.
9. Ishimura, N.; Fukuda, R. & Fukumoto, S. Hepatitis C: relationship between the intrahepatic expression of interferon- α receptor mRNA and the histological progress of hepatitis C virus-associated chronic liver diseases. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 11:712-717, 1996.
10. Liu, J.; Zhang, Y.L.; Spence, M.J.; Vestal, R.E.; Wallace, P.M. & Grass, D.S. Liver LDL receptor mRNA expression is decreased in human ApoB/CETP double transgenic mice and is regulated by diet as well as the cytokine oncostatin M. *Arterioscler. Thromb. Vas. Biol.* 2948-2954, 1997.
11. Ness, G.C.; Chambers, C.M. & Lopez, D. Atorvastatin action involves diminished recovery of hepatic HMG-CoA reductase activity. *J. Lipid Res.* 39: 75-84, 1998.
12. Pham, K.; LaForge, K.S. & Kreek, M.J. Comparison of methods for quantitation of radioactivity in protected hybrids in RNase protection assays. *BioTechniques.* 25: 198-206, 1998.
13. Powell, E.E. & Kroon, P.A. Low density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in human mononuclear leukocytes is regulated coordinately and parallels gene expression in human liver. *J. Clin. Invest.* 93: 2168-2174, 1994.
14. Rosner B. *Fundamentals of biostatistics.* 2nd ed. Boston: PWS, 1986.
15. Sambrook, J.; Fritsch, E.R. & Maniatis, T. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989; E10-E14.
16. Siebert, P. *The PCR Technique: RT-PCR.* BioTechniques Books, Eaton Publishing, 1998.
17. Tokunaga, K.; Nakamura, Y.; Sakata, K.; Fujimori, K.; Ohkubo, M.; Sawada, K. & Sakiyama, S. Enhanced expression of a glyceroldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancer. *Cancer Res.* 47: 5616-5619, 1987.
18. Yu, L.; Qiu, S.; Genest Jr., J. Abnormal regulation of the LDL-R and HMG CoA reductase genes in subjects with familial hypercholesterolemia with the "French Canadian Mutation". *Atherosclerosis.* 124: 103-117, 1996.

Endereço para correspondência

Prof. Luis Salazar Navarrete
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF
Universidade de São Paulo
Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP, 05508-900, Brasil
Fax: (0xx11) 813-2197 - e-mail: luisn@usp.br

Efeitos de corantes naturais nos níveis séricos de colesterol e colesterol-HDL em ratos hiperlipidêmicos

Effects of natural dyes on seric levels of cholesterol and HDL-cholesterol in hyperlipidemic rats

Silva¹, R. C.; Valente¹, S. T. X.; 1.; Oliveira¹, T. T.; Nagem², T. J.; Pinto³, A. S. & Costa⁴, N. M. B.

RESUMO - Distúrbios no metabolismo lipídico tem levado a uma série de desordens do organismo, dentre elas as hiperlipidemias primárias, defeitos na via exógena, alterações no metabolismo de LDL, etc. O presente trabalho avaliou a ação de cúrcuma, antocianina, carmin e monascus nas doses de quarenta e oitenta miligramas misturados à ração Nuvilab e fornecidos a ratos Wistar hiperlipidêmicos induzidos por Triton. Os resultados indicaram uma percentagem de redução nos níveis de colesterol total sérico de 22,1, 31,6, 32,1 e 22,7% respectivamente para os corantes cúrcuma, antocianina, carmin e monascus e de 20,1, 17,9, 12,6 e 18,1% para a mesma sequência de corantes em relação ao colesterol – HDL.

PALAVRAS-CHAVE - Colesterol; cúrcuma; antocianina.

SUMMARY - Disturbances in the lipidic metabolism produce a series of disorders in the organism, including the primary hyperlipidemias, defects in the exogenous route, changing in the LDL-metabolism. This work evaluates the action of curcumin, anthocyanin, carmin and monascus natural dyes in the dosis of forty and eighty milligrams mixed to the ration Nuvilab and supplied to male hyperlipidaemic rats Wistar induced by Triton. The results showed a reduction in the cholesterol seric levels of 22.1, 31.6, 32.1 and 22.7% for curcuma, anthocyanin, carmin and monascus respectively and 20.1, 17.9, 12.6 and 18.1% for the same sequence of natural dyes in relation to the HDL-cholesterol.

KEY WORDS - Cholesterol; curcuma; anticynin; carmine; monascus.

INTRODUÇÃO

Distúrbios no metabolismo lipídico tem levado a uma série de desordens do organismo tais como hiperlipidemias primárias, defeitos na via exógena (produção da apolipoproteína B, deficiência familiar de lipase e de apolipoproteína C-II), aumento no nível da apolipoproteína C-III, inibição da lipase lipoproteica, etc e na via endógena alterações no metabolismo de VLDL, alterações no metabolismo de LDL, dislipidemias secundárias, hipertrigliceridemia. Todas elas são consideradas fatores de risco para a aterosclerose, processo em que IDL e VLDL se infiltram através da parede endotelial e depositam-se na íntima das paredes vasculares. Este processo parece ser facilitado por algumas lesões preexistentes. Embora algumas lipoproteínas que atravessam o endotélio possam ser reabsorvidas, voltando novamente para a circulação através das artérias, uma grande quantidade se deposita na íntima

e ali permanece, em virtude de sua afinidade pelos mucopolissacarídeos e pelo colágeno, componentes essenciais do tecido conjuntivo das diversas camadas das paredes vasculares. A aderência de monócitos que circundam o endotélio vascular é um dos primeiros passos detectados na aterosclerose induzida de modo experimental. Logo em seguida, a camada íntima das paredes vascular, as lipoproteínas aterogênicas sofrem uma série de modificações que lhes permitem continuar o processo aterogênico, sendo uma das principais a oxidação. A oxidação de LDL produz maior atração e inibição da migração dos macrófagos e, sendo citotóxico, lesa a camada endotelial vascular predispondo a um novo e maior depósito de LDL, assim como, de macrófagos. A terceira fase da aterogênese, representada pela placa aterosclerótica complicada, manifesta-se por sua calcificação, hemorragia e fissura, consequentemente com trombose local, obstrução da luz do vaso sanguíneo e aparecimento de isquemia e pos-

Recebido em 20/3/2000

Aprovado em 12/4/2000

¹Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

²Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, 35400-000, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

³Departamento de Veterinária, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

⁴Departamento de Nutrição, Universidade Federal de Viçosa, 36571-000, Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

terior necrose do tecido irrigado por tais artérias (Bostom *et al*, 1996).

Estudos experimentais envolvendo corantes naturais, têm mostrado que, além de conferirem cor aos alimentos, alguns deles não se apresentam como substâncias totalmente inócuas ao organismo. Estudos feitos com diferentes doses, com a segurança de quantidades para sua utilização, de suas propriedades fisiológicas e farmacológicas atribuem suas ações aos seus princípios ativos (Srinivasan *et al*, 1991, Ramaprasad *et al*, 1956, Marmion *et al*, 1991).

Hoje se sabe que os efeitos dos corantes naturais no metabolismo lipídico, principalmente na redução dos níveis de colesterol na corrente sangüínea de animais experimentais é uma verdade apesar das poucas publicações disponíveis.

A curcumina, princípio corante da cúrcuma é obtido a partir dos rizomas da planta *Curcuma longa* L. e possui propriedades farmacológicas como antiinflamatória e hipocolesterolêmica no organismo animal, além de provocar o aumento da secreção biliar e da excreção biliar e da excreção de sais biliares, colesterol e bilirrubina (Ammon e Whal, 1991).

As antocianinas, juntamente com outros flavonóides, amplamente encontradas em vegetais, são substâncias ativas como antioxidantes e antiinflamatórias, que atuam também no metabolismo lipídico em animais experimentais (Igarashi *et al*, 1990; Tamura e Yamagami, 1994).

Tradicionalmente utilizado pelos povos asiáticos, o corante monascus, produzido pela fermentação do arroz por fungos do gênero *Monascus*, encontra aplicação em alimentos devido às suas propriedades corantes, organolépticas e antimicrobianas, embora Fink-Gremmels e Leistner, 1989, tenham demonstrado efeito na redução dos níveis de lipídeos séricos, em animais experimentais, com o uso de um extrato metanólico dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus*.

Considerando, portanto a maior utilização destes corantes, principalmente através de produtos industrializados, e a necessidade do melhor conhecimento de seus efeitos no organismo humano, este trabalho procurou avaliar os corantes cúrcuma, antocianina (de cascas de uva), carmim e monascus quanto ao potencial efeito de redução dos níveis de colesterol e colesterol-HDL sangüíneos, em ratos hiperlipidêmicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Os ensaios biológicos foram realizados utilizando-se ratos machos albinos da raça Wistar, com 60 dias de vida, provenientes do Departamento de Nutrição e Saúde da Universidade Federal de Viçosa. No período pré-experimental os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, à temperatura ambiente, ciclo de claro-escuro de 12 horas e tiveram livre acesso ração Nuvi-lab CR1 e água à vontade. Os corantes utilizados foram fornecidos pela Christian Hansen Ind. E Comércio Ltda, com as seguintes especificações:

- *Corante natural de cúrcuma em pó* - É um óleo solúvel, produzido a partir da extração da oleoresina

das raízes de *Curcuma longa* L. com uso de solventes aprovados pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO), e purificado por cristalização, possuindo um teor total de curcumina de, no mínimo, 94%. Conferem diferentes tonalidades de cor que vão do amarelo-brilhante ao amarelo-esverdeado.

- Já a *antocianina* é um pó hidrossolúvel, produzido a partir da extração aquosa da casca da uva. O extrato é concentrado por evaporação a vácuo, durante a qual as impurezas são removidas. Em valores de pH abaixo de 5, fornecem tonalidades que variam de rosaclearo a vermelho framboesa. Em valores de pH maiores, variam de vermelho-azulado a azul. Os maiores princípios ativos são peonidina, malvidina, delphinidina e petunidina. Sua força corante é -1125-1375 unidades/g.

- *Carmim* é um pó, solúvel em soluções alcalinas e dispersível em água, gordura e óleos, constituindo-se numa laca da alumínio do ácido carmínico. Fornece tonalidades vermelho-claro ou escuras, dependendo do produto alimentício onde é aplicado e da quantidade empregada. Sua força corante é -47,5 unidades/g a 52,5% de ácido carmínico.

- *Monascus* é um pó fino usado na preparação de alimentos asiáticos. O produto fornece uma coloração vermelha, resultado da fermentação do amido de arroz pelo microorganismo *Monascus purpureus*. De flavour típico, constitui-se num preparado para ser usado no tempero de alimentos, na dosagem de 0,5-1g/Kg.

A substância utilizada para induzir a hiperlipidemia nos ratos foi o Triton WR 1339, ou tyloxapol (Sigma), um detergente não aniônico, de estrutura polimérica muito utilizado pelos pesquisadores neste tipo de experimento (Mathur *et al*, 1964, Siddiqui *et al*, 1996, Sharma, 1979, Choi *et al*, 1991).

Neste trabalho, foram realizados dois experimentos, utilizando-se setenta e dois ratos sendo sessenta deles hiperlipidêmicos. Destes, quarenta e oito receberam os corantes isoladamente nas doses de 40 mg e 80 mg. A substância indutora da hiperlipidemia Triton WR-1339 foi injetada intraperitonealmente nos animais, na dose de 300mg/kg de peso corporal, dissolvido em solução salina (NaCl 0,15M), de modo a obter-se uma solução com concentração de 78 mg/mL. De acordo com o peso dos animais, foram aplicados diferentes quantidades dessa solução, utilizando-se seringas descartáveis com capacidade de 1mL. Vinte e quatro horas após a injeção de Triton WR-1339 nos 60 ratos, estes foram divididos em grupos de 6 animais, com peso médio inicial de 225 g e distribuídos conforme os seguintes tratamentos:

Grupo 1 - (Ração)

Grupo 2 - (Ração + Triton)

Grupo 3 - (Ração + Triton + Cúrcuma)

Grupo 4 - (Ração + Triton + Antocianina)

Grupo 5 - (Ração + Triton + Carmim)

Grupo 6 - (Ração + Triton + Monascus).

No experimento I estes corantes foram administrados na forma de pó na dose única de 40 mg, mistura-

QUADRO I
Valores médios de colesterol total sérico ($\pm$ erro padrão) de soros de ratos Wistar nos experimentos I e II e suas respectivas médias

Grupos	Doses		Médias
	40 mg	80 mg	
1-Ração	66,80 $\pm$ 2,34	67,69 $\pm$ 2,08	67,25 $\pm$ 1,50
2- Ração + Triton	119,06 $\pm$ 3,62	117,90 $\pm$ 1,32	118,48 $\pm$ 1,95 A
3- Ração + Triton + Cúrcuma	94,03 $\pm$ 1,83	88,24 $\pm$ 1,96	91,14 $\pm$ 1,55 B
4- Ração + Triton + Antocianina	81,57 $\pm$ 1,94	78,41 $\pm$ 1,64	79,99 $\pm$ 1,30 B
5-Ração + Triton + Carmim	82,40 $\pm$ 0,98	76,33 $\pm$ 1,25	79,37 $\pm$ 1,19 B
6-Ração + Triton + Monascus	96,14 $\pm$ 2,65	84,53 $\pm$ 1,27	90,34 $\pm$ 2,24 B
Média	94,64 A	88,46 B	

Na linha A > B, pelo teste F • Na coluna, b difere de a, pelo teste de Dunnett (P < 0,05).

QUADRO II
Valores médios de colesterol-HDL sérico ($\pm$ erro padrão) de soros de ratos Wistar nos experimentos I e II e suas respectivas médias

Grupos	Doses		Médias
	40 mg	80 mg	
1-Ração	47,87 $\pm$ 2,16	49,47 $\pm$ 2,51	48,67 $\pm$ 1,60
2- Ração + Triton	78,16 $\pm$ 2,97	72,57 $\pm$ 2,79	75,37 $\pm$ 2,12 A
3- Ração + Triton + Cúrcuma	65,89 $\pm$ 1,41	54,51 $\pm$ 2,87	60,20 $\pm$ 2,30 B
4- Ração + Triton + Antocianina	66,50 $\pm$ 2,50	57,29 $\pm$ 3,75	61,90 $\pm$ 2,56 B
5-Ração + Triton + Carmim	69,81 $\pm$ 2,24	61,88 $\pm$ 6,60	65,85 $\pm$ 3,53 B
6-Ração + Triton + Monascus	68,50 $\pm$ 1,19	54,98 $\pm$ 2,56	61,74 $\pm$ 2,44 B
Média	69,77 A	60,25 B	

Na linha A > B, pelo teste F • Na coluna, b difere de a, pelo teste de Dunnett (P < 0,05).

dos à 10g de ração comercial Nuvilab e no experimento II na dose única de 80 mg, nas mesmas condições anteriores. Quarenta e oito horas após a aplicação do Triton WR-1339, todos os animais foram anestesiados por inalação com éter etílico e por punção cardíaca foram retiradas as amostras de sangue. Estas foram centrifugadas a 7100 x G, por 15 minutos, para separação do soro, e mantidas a 8°C até o momento das análises. As dosagens de colesterol e colesterol-HDL

foram realizadas segundo metodologia proposta por Allain *et al*, 1974, utilizando-se o método enzimático da marca Analisa. A análise estatística foi realizada com o delineamento experimental inteiramente casualizado com cinco tratamentos (Ração + Triton, Ração + Triton + Cúrcuma, Ração + Triton + Antocianina, Ração + Triton + Carmim, Ração + Triton + Monascus) e seis repetições, em que foram empregadas 40 mg e 80 mg de substâncias. Os dados foram analisados por meio de análise de variância individual, para as duas variáveis em estudo (Colesterol e Colesterol-HDL). O teste de Dunnett, adotando-se um nível de 5% de colesterol total, colesterol-HDL foram obtidos dos grupos tratados com os corantes, com o valor médio do grupo-controle. A dispersão das médias foi expressa pelo erro padrão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de colesterol total e colesterol-HDL séricos encontram-se descritos nos Quadros I e II, expressos em mg/dL, com suas respectivas médias entre os dois experimentos.

Os resultados indicam uma percentagem de redução dos níveis de colesterol total sérico de 22,1, 31,6, 32,1 e 22,7% respectivamente para os grupos 3,4,5,6.

A redução de 22,1% do nível de colesterol total sérico apresentado pelo grupo 3 (cúrcuma), é concordante com os dados da literatura sobre o efeito apresentado por extratos da planta *Curcuma longa* L. (Valente, 1998) e por estudos com curcumina, capsaicina, gengibre, mostarda, pimenta do reino, cominho e seus efeitos sobre a atividade da enzima 7-a-hidroxilase e sobre os níveis de colesterol em ratos (Srinivasan *et al*, 1991). O autor sugere que, por ativar a enzima de con-

versão de colesterol para ácidos biliares, este deve ser um possível mecanismo de ação para estes compostos na eliminação do colesterol do corpo e, portanto, uma das possíveis explicações para a redução de colesterol pelo tratamento com curcumina.

Quanto ao corante carmim, um aditivo corante com longa história de uso em alimentos, não se conhece ainda seu possível mecanismo de ação.

Já as antocianinas juntamente com outros flavonói-

des têm comprovados efeitos no metabolismo lipídico. Constitui uma classe de substâncias que tem mostrado suas ações como antioxidantes (Tsuda *et al*, 1994), ação antitrombótica, (Gryglewski *et al*, 1987), efeitos antiinflamatórios (Pelzer *et al*, 1998), inibição da modificação oxidativa de lipoproteínas LDL (Whalley *et al*, 1990), e, com certeza se constituirá no futuro num dos possíveis fármacos no tratamento do colesterol e na prevenção de doenças cardíacas.

Os resultados obtidos neste trabalho com o corante monascus, não constitui surpresa pois resultados semelhantes também foram encontrados por Fink-Gremmels & Leistner, 1989, utilizando extrato metanólico dos pigmentos produzidos por *Monascus purpureus*, testado em ratos com dieta induzindo hiperlipidemia.

Este corante é utilizado pelos povos asiáticos como condimento e corante, assim como para estabilidade microbiológica de produtos de carne e peixe. Sabe-se hoje que uma espécie deste fungo do gênero monascus, *Monascus ruber*, produz, como resultado do seu metabolismo, monacolina K, um composto com ação hipocolesterolêmica que inibe a enzima HMG-CoA redutase. A literatura não registra a produção deste metabólito por *Monascus purpureus*.

Os resultados apresentados no Quadro II para colesterol-HDL mostram efeitos similares aos obtidos nos níveis de colesterol total. Todos os corantes testados apresentaram efeito de redução significativo dos valores de HDL-colesterol quando comparados ao grupo-controle, com redução de 20,1 % para o grupo 3, 17,9% para o grupo 4, 12,6% para o grupo 5 e 18,1% para o grupo 6. A maior dose, 80 mg, apresentou também maior efeito de redução em relação à dose de 40 mg, sendo esta redução em torno de 13,6%.

Reduzir os níveis elevados de colesterol sanguíneo é considerado de extrema importância no organismo humano. Hoje já está estabelecida relação entre níveis elevados de colesterol e aterosclerose, levando ao

surgimento de doenças vasculares cardíacas, encefálicas e periféricas, de grande incidência em nossa população.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Allain, C. C.; Poon, L. S.; Chan, C. S.; Richmond, W. Fu, P. C. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* Washington, 20:4, 470-475, 1974.
2. Ammon, H. P. T.; Wahl, M. A. Pharmacology of *Curcuma longa* -Review. *Plant Med.* Stuttgart, 57: 1-7, 1991.
3. Bostom, A. G. Elevated plasma lipoprotein (a) and coronary heart disease in men aged 55 years and younger. *JAMA*, 276: 544-548, 1996.
4. Choi, J. S.; Yokosawa, T.; Oura, H. Antiatherogenic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. *J. Natural Products*, 54:1, 218-224, 1991.
5. Fink-Gremmels, J., Leistner, L. Biological effects of *Monascus purpureus*. *Fleischwirtsch*, Frankfurt, 69:1, 115-122, 1989.
6. Gryglewski, R. J.; Korbut, R.; Robak, J.; Swies, J. On the mechanism of antithrombotic action of flavonoids. *Biochemical Pharmacology* 36:3, 17-322, 1987.
7. Igarashi, K.; Abe, S.; Satoh, J. Effects of Atsumi-kabu (Red Turnip, *Brassica campestris* L.) anthocyanin on serum cholesterol levels in cholesterol-fed rats. *Agric. Biol. Chem. Tokyo*, 54:1, 171-175, 1990.
8. Marmion, D. M. *Handbook of U. S. colorants foods, drugs, cosmetics and medical devices*. 3 ed, Ed John Wiley & Sons, Inc, 573p., 1991.
9. Mathur, K. S.; Singhal, S. S.; Sharma, R. D. Effect of Bengal gram on Experimentally induced high levels of cholesterol in tissues and serum in Albino rats. *J. Nutrition*, 84: 201-204, 1964.
10. Pelzer, L. E.; Guardia, T.; Juarez, A.O.; Guerreiro, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Il farmaco*, 53: 421-424, 1998.
11. Ramaprasad, C. And Sirsi, M. Studies on Indian Medicinal plants: *Curcuma longa* Linn. Effect of curcumin and the essential oils of *Curcuma longa* on bile secretion. *J. Sci. Ind. Res.* 15C: 262 - 266, 1956.
12. Siddiqui, M. T.; Siddiqui, M. Hypolipidemic principles of *Cicer arietanum*: Biochanin A and Formononetin. *Lipids*, 11: 3, 1975- 1978, 1996.
13. Sharma, R. D. Effect of various isoflavones on lipid levels in triton treated rats. *Atherosclerosis*, 33: 371-375, 1979.
14. Srinivasan, K. And Sambaiah, K. The effect of spices on cholesterol 7 α -hydroxylase activity and on serum and hepatic cholesterol levels in the rat. *Intern. J. Vit. Nutr. Res.* 61: 364-369, 1991.
15. Tamura, H.; Yamagami, A. Antioxidative activity of monacylated anthocyanins isolated from *Muscataleya* grape. *J. Agric. Food Chem.* Washington, 42:8, 1612-1614, 1994.
16. Tsuda, T.; Watanabe, M.; Katsumi, O. Norinobu, S.; Choi, S.; Kawakishi, S.; Osawa, T. Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-O-b-Glucoside and cyanidin. *J. Agric. Food Chem.* 42:11, 2407-2410, 1994.
17. Whalley, C. V.; Rankin, S. M.; Robin, J.; Hoult, S.; Wendy, J.; Leake, D. S. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochemical Pharmacology*, 39:11, 1743-1750, 1990.

Saiba o que é preciso para ter o seu

Título de Especialista em Análises Clínicas pela SBAC

As provas para a concessão do Título de Especialista em Análises Clínicas, outorgado pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, são aplicadas durante a realização dos congressos realizados pela entidade.

Entre em contato através dos tel/fax (0xx21)264-4449 e (0xx21)204-0245 ou pelo e-mail: geral@sbac.org.br, e conheça as normas do regulamento para a concessão desse título.

Infecções oportunistas por protozoários parasitos: uma revisão sobre *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* e microsporídios

Opportunistic infections caused by protozoan parasites: a review of *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* and microsporidia

Geraldo Attilio De Carli*

RESUMO – *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis*, *Isospora belli* e várias espécies de microsporídios são reconhecidos atualmente como protozoários parasitos emergentes e oportunistas para o homem. Os organismos membros dos grupos de coccídios e microsporídios, com ampla distribuição geográfica, são reportados também com aumento de frequência nas populações de imunocompetentes e imunocompromissados. Esses parasitos são transmitidos, principalmente, pela água, mas são descritas infecções através dos alimentos. Os organismos são responsáveis por surtos agudos de diarreia com várias outras seqüelas relacionadas com a doença. Os coccídios incluem três gêneros – *Cryptosporidium*, *Cyclospora* e *Isospora*. Os dois últimos são de menor importância em termos de mortalidade e morbidade. Os microsporídios incluem gêneros (*Enterocytozoon*, *Encephalitozoon*) que somente agora estão sendo reconhecidos como importantes agentes de doenças. As mais importantes rotas de transmissão dos microsporídios no homem é a ingestão ou inalação de esporos. Diferentemente dos coccídios, esses organismos estão mais restritos às populações de imunocomprometidos. O aumento da incidência e o número de pacientes com diarreia prolongada devida a esses parasitos indicam a necessidade de aumentar a vigilância clínica relacionada com prevenção, diagnóstico e tratamento.

PALAVRAS-CHAVE - Coccídios; Microsporídios; *Cryptosporidium parvum*; *Cyclospora cayetanensis*; *Isospora belli*; *Enterocytozoon bienzei*; *Encephalitozoon intestinalis*.

SUMMARY - *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* and *Isospora belli* as well as several species of microsporidia are recognized as emerging protozoan pathogens of humans. All are obligate intracellular parasites, with *Isospora* and microsporidia being primarily associated with immunocompromised hosts. These parasites are responsible for acute, as well as protracted, cases of watery diarrhea with various other related sequelae. The coccidia can be transmitted by ingestion of water or food contaminated with oocysts, and the most common routes of infection of microsporidia in mammals are ingestion or inhalation of spores

KEY WORDS - Coccidia; Microsporidia; *Cryptosporidium parvum*; *Cyclospora cayetanensis*; *Isospora belli*; *Enterocytozoon bienzei*; *Encephalitozoon intestinalis*.

INTRODUÇÃO

A descrição de novos agentes de doenças humanas e mudanças na nomenclatura ocorrem em todos os grupos de organismos patogênicos. Essas mudanças são esperadas devido ao avanço da tecnologia que capacita um diagnóstico mais preciso das doenças infecciosas e um maior conhecimento da relação genética

entre a etiologia dos agentes²⁰. Soma-se a isto, a pandemia do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e a relatada expansão da população de imunocomprometidos que tem contribuído para o aumento do número de indivíduos infectados com patógenos oportunistas. Esses protozoários parasitos são membros de dois grupos, os Coccídios e os Microsporídios.

Os coccídios e os microsporídios intestinais são

Recebido em 24/8/2000

Aprovado em 31/8/2000

*Professor Titular de Parasitologia Clínica. Faculdade de Farmácia, Departamento de Análises Clínicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)
Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS, 90619-900, Brasil • E-mail: gdecarli@portoweb.com.br

descritos como organismos intracelulares, parasitos comuns de vários vertebrados, incluindo o homem. A relação dos animais considerados reservatórios para as infecções humanas não está totalmente esclarecida, mas devido a organismos parasitos semelhantes, possivelmente idênticos, encontrados entre animais domésticos, em fazendas e entre animais de estimação nas cidades, como também em animais selvagens, existem grandes possibilidades de relação de sua etiologia com as doenças humanas. A morfologia desses estágios é idêntica. Apesar, de as formas intracelulares serem diagnosticadas através de espécimes biospiados, os estágios excretados fornecem as informações requeridas para o diagnóstico específico.

O microscópio é o principal instrumento para a identificação dos parasitos, principalmente nos espécimens fecais. Consequentemente, se não houver uma cuidadosa morfometria, a importância da microscopia será limitada. O micrômetro ocular deve ser usado na identificação dos parasitos como um procedimento obrigatório.

Coccídios

Os coccídios intestinais dos gêneros *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Isospora* e *Sarcocystis* são parasitos intracelulares obrigatórios, que habitam a mucosa do intestino delgado do homem. Os gêneros *Cryptosporidium* e *Cyclospora* constituem dois grupos de protozoários parasitos, responsáveis por gastroenterite transitória. A criptosporidiose é uma antroponose, muito bem conhecida pelos veterinários, que veio fazer parte da patologia humana, causando problemas graves e prolongados em imunodeficientes, notadamente em doentes acometidos pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS). As manifestações da criptosporidiose podem ser agrupadas em dois tipos, dependendo do estado do portador: gastroenterite transitória, em pacientes imunocomprometidos, e manifestações persistentes, com sinais e sintomas clínicos marcados em pacientes imunodeprimidos.

O gênero *Cyclospora* encontrado nas fezes de pacientes imunocompetentes ou imunocompromissados, de sídticos/aidéticos e de viajantes provenientes de países em desenvolvimento e/ou de regiões tropicais, tem sido caracterizado por fadiga (de moderada a severa), náuseas, anorexia, mialgia, perda de peso e intensa diarreia. Durante os últimos anos, a ciclosporose tem sido descrita em vários surtos de diarreia na América Central e América do Sul, no Caribe, África, Bangladesh, no sul e oeste da Ásia, Austrália, Inglaterra e Europa oriental. As rotas de transmissão da ciclosporose ainda são desconhecidas. Paralelamente, entretanto a principal é a fecal-oral, como também via água. A infecção por *I. belli* ou isosporose tem sido diagnosticada em pacientes com SIDA/AIDS. A maioria dos protozoários intestinais são transmitidos através da contaminação fecal dos alimentos e líquidos.

Entretanto o homem é infectado pelo *Sarcocystis hominis* e *Sarcocystis suihominis* pela ingestão, respectiva, de carne de bovinos ou de suínos, crua ou mal cozida, contaminada com sarcocistos maduros contendo bradizoítos. As infecções pelo gênero *Sarcocystis* ocorre em uma variedade de hospedeiros, incluindo o homem. A sarcocistose não é uma doença muito bem conhecida no homem. Os hospedeiros imunocomprometidos infectados pelas espécies *S. hominis* e *S. suihominis* apresentam febre, diarreia grave, dor abdominal e perda de peso.

Os oocistos maduros e os esporocistos livres desses coccídios são transparentes e de difícil visualização em esfregaços não corados, necessitando de coloração específica para serem identificados. A morfologia dessas formas é similar. Os estágios de diagnóstico (oocistos) dos coccídios são diferenciados pelo tamanho, e a morfologia deve ser cuidadosamente examinada através de esfregaços corados pela microscopia óptica. Os oocistos podem não conter o esporocisto (como o *Cryptosporidium*) mas todas as espécies possuem as formas de esporozoítos.

Cryptosporidium parvum

Até 1978 os oocistos do *Cryptosporidium* spp. não eram pesquisados nas fezes dos hospedeiros humanos infectados²⁵. Consequentemente, o diagnóstico biológico dependia da evidência histológica desse organismo nos tecidos. O *C. parvum* difere dos outros coccídios em relação ao desenvolvimento de seus estágios, que ocorrem intracelularmente com localização extracitoplasmática nas células dos hospedeiros. O diagnóstico definitivo da criptosporidiose baseia-se na demonstração dos oocistos nas fezes. Entretanto, inúmeras dificuldades são encontradas na realização desse diagnóstico. Nos indivíduos imunocompetentes, os parasitos são identificados nas fezes 3 dias após a contaminação, e o tempo de emissão é curto (2 ou 3 semanas), não havendo abundância. Nos pacientes imunodeprimidos, a permanência dos oocistos pode ser indefinida, correspondendo aos períodos de diarreia. Essa diarreia aquosa acarreta a diluição dos parasitos e a aceleração das evacuações, com presença de muco e de numerosos restos de vegetais que podem mascarar a pesquisa.

A emissão dos oocistos é descontínua, sendo necessária a realização de várias colheitas e exames a cada 3 dias antes de concluir pela ausência do protozoário. Ao contrário dos parasitos, que são raros, as leveduras são com frequência, abundantes e deverão ser diferenciadas do *Cryptosporidium* que tem o mesmo tamanho. Em razão do risco de contaminação do operador é necessário tomar precauções durante a manipulação (usar luvas durante todas as etapas dos procedimentos de coloração, descontaminar o material e incinerar os resíduos). Quando as fezes forem provenientes de pacientes com SIDA/AIDS, os laboratórios deverão tomar os mesmos cuidados usados para a hepatite.

Os métodos de coloração derivados da fucsina-fenica foram modificados e aperfeiçoados. Os métodos modificados de Ziehl-Neelsen (a quente) e o de Kinyoun (a frio)^{20,21,22} foram descritos somente em 1983^{31,47}. Modificações adicionais incluíram a incorporação do dimetilsulfóxido (DMSO) à coloração de Ziehl-Neelsen^{10,63} e a adição do tergitol à modificação a frio do procedimento de Kinyoun⁴⁸. Uma das vantagens dos métodos derivados de Ziehl-Neelsen é a facilidade de identificação de outros parasitos (por. ex. *Isospora* e *Cyclospora*) no esfregaço fecal, os quais não seriam diagnosticados através de testes específicos, como a imunofluorescência e/ou o enzimaimunoensaio. Métodos alternativos de microscopia óptica incluem: a coloração negativa^{15,19,43,62}; a coloração a quente da safranina-azul de metileno^{4,5}; a coloração modificada de Kohn³; a coloração modificada de Koster⁴¹; a anilina-carbometil violeta e a tartrazina⁴⁹.

Cyclospora cayetanensis

Os ciclosporídeos provavelmente foram descritos pela primeira vez em 1870 por Eimer no intestino de toupeiras²⁸; entretanto o gênero foi criado em 1881 por Schneider⁶⁶. A primeira publicação sobre infecções referentes a *Cycl. cayetanensis* foi feita por Ashford (1979)² que a identificou como *Isospora* tipo coccídio nas fezes de três indivíduos em Papua, Nova Guiné. Em 1989, Narango et al.⁵⁴ descreveram o mesmo organismo em peruanos com diarreia crônica e relataram o organismo como um coccídio tipo *C. parvum*. Alguns investigadores suspeitavam que os oocistos de *Cycl. cayetanensis* não esporulados eram semelhantes à cianobactéria e a denominaram como “organismo tipo cianobactéria” (CLB) porque a CLB era citada com grande frequência na literatura. Ortega et al. (1992)⁵⁶ mostraram, em uma comunicação breve, que os oocistos desse organismo eram esporulados e existidos, resultando dessa descrição a colocação do parasito no gênero *Cyclospora*. A espécie, *Cycl. cayetanensis* também foi criada nesse mesmo ano.

A partir de 1985, começaram a ser descritos com grande frequência, no mundo inteiro, organismos com tamanho de aproximadamente 8 a 10µm de diâmetro, apresentando coloração que vai do rosa ao púrpura, pela coloração de preparações fixadas e coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen^{8,9,10,11,33,34,35} e autofluorescência quando submetidos à luz ultravioleta (UV)⁷. Os oocistos de *Cycl. cayetanensis* assemelham-se aos oocistos do *C. parvum*, mas não apresentam morfologia interna bem definida, e a intensidade de cor tende ser mais variável (variabilidade de coloração) do que aquela vista no *Cryptosporidium* e na *Isospora*. Entretanto, como as informações morfológicas não foram apresentadas na comunicação de Ortega et al. (1992)⁵⁶, a *Cycl. cayetanensis* tecnicamente tornou-se *nomen nudum* (nome de espécie sem a descrição). Em 1993, Ortega et al.⁵⁷ apresentaram descrições adicionais sobre esse novo coccídio e, em 1994, Ortega et al.⁵⁸ publicaram

uma completa descrição morfológica do parasito, validando o nome do coccídio. Dessa maneira, o nome correto para esse parasito é *Cycl. cayetanensis* Ortega, Gilman e Sterling, 1994⁵⁸ e a etimologia do *nomen triviale* foi derivada da Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru, onde inicialmente o parasito foi estudado⁵⁹.

A *Cycl. cayetanensis*, coccídio protista, é um protozoário patogênico para o homem. A ciclosporose é caracterizada por moderada à severa fadiga, náuseas, anorexia, mialgia, perda de peso e intensa diarreia, com 1 a 8 evacuações diárias por 1 a 3 semanas^{14,17,74,75,76}. A diarreia usualmente é intermitente, mas autolimitada e os pacientes imunocompetentes apresentam evacuações que variam de 4 a 107 dias. Os sintomas se manifestam, geralmente, uma semana após a ingestão dos oocistos, podendo persistir por meses. O intestino delgado apresenta inflamação e o parasita causa mudanças na mucosa, incluindo atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas intestinais. Infecções moderadas produzem poucos sinais clínicos ou até mesmo nenhum^{16,18,23,56,58}.

Pacientes com SIDA/AIDS podem ser infectados pela *Cycl. cayetanensis*^{58,71}. Estudos baseados em evidências histológicas mostraram a possibilidade de que os pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS) tendem em hospedar um número maior de parasitos do que os indivíduos imunocompetentes infectados com o mesmo organismo. Pesquisas realizadas com pacientes infectados pela SIDA/AIDS em Lima, Peru, mostraram que somente 1% dos 126 doentes que apresentavam diarreia estavam infectados com *Cyclospora*^{24,57,58}. Resultados semelhantes com pacientes sidéticos foram observados nos Estados Unidos da América do Norte e Europa. Provavelmente, esse fato é devido ao uso frequente do sulfametoxazol + trimetoprima (TMP-SMX) para a profilaxia do *Pneumocystis carinii*. A alta prevalência de *Cycl. cayetanensis* em pacientes com SIDA/AIDS no Haiti é o resultado do uso restrito do TMP-SMX na profilaxia do fungo^{24,57,58}.

Os oocistos da *Cycl. cayetanensis* são excretados intermitentemente, esporadicamente e raramente em pequeno número. Os oocistos não são esporulados quando excretados nas fezes, pois necessitam de uma a duas semanas em condições ideais de temperatura para se tornarem esporulados. Os oocistos esporulados são arredondados, com 8 a 9 µm (variando de 8 a 10 µm) de diâmetro (Figura 1). Cada oocisto esporulado possui dois esporocistos ovais (4,0 x 6,3µm) e cada esporocisto apresenta dois esporozoítos (1,2x9,0µm)^{57,58,76}. Os oocistos possuem uma evidente e bem definida parede cística e mostram internamente agrupamentos de glóbulos refrateis, rodeados por uma membrana espessa. Esses glóbulos internos coram-se de castanho pela solução de iodo.

Os oocistos da *Cyclospora* são duas vezes maiores em tamanho do que aqueles dos estágios de diagnós-

TABELA 1
Comparação entre *Cyclospora*, *Cryptosporidium* e *Isospora*

	<i>Cyclospora</i>	<i>Cryptosporidium</i>	<i>Isospora</i>
Número de esporocistos em cada oocisto	2	0	2
Número de esporozoítos em cada esporocisto	2	4 esporozoítos livres	4
Tamanho dos oocistos nos tecidos (mm)	4-16	2-5	3-15
Estágio nas fezes	Oocisto	Oocisto	Oocisto
Tamanho dos oocistos nas fezes (mm)	8-10	4-5	9-16x7,5-12
Coloração específica para amostras fecais	Safranina*	Kinyoun/Safranina*	Kinyoun/Safranina*
Autofluorescência	Presente	Ausente	Presente

*Safranina (a quente)

tico de *C. parvum* (arredondados, esféricos ou ovais, com 4 a 5µm de diâmetro) e um terço menores do que a *I. belli* (elipsóides, 20 a 30 x 10 a 19µm)^{1,58}. A morfometria com o micrômetro ocular é indispensável para a identificação das espécies³⁸ (Tabela 1). Devido às limitações do exame microscópico de preparações a fresco, vários métodos de coloração favorecem o diagnóstico da *Cycl. cayetanensis*. Os oocistos da *Cyclospora* são diagnosticados pela coloração de preparações fixadas e coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen^{27,37,73}, pela safranina modificada^{5,24,76}, pela autofluorescência (ação da luz ultravioleta - UV)^{8,16} e pela utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR)²⁹. As variações da coloração de Ziehl-Neelsen não são tão eficazes para essa espécie como para os outros coccídios intestinais (*C. parvum* e *I. belli*).

Curiosa e inexplicavelmente, a *Cyclospora* exibe uma marcada variabilidade de coloração quando corada pelos derivados de Ziehl-Neelsen, alguns oocistos não são visualizados. Os oocistos coram-se do rosa ao vermelho e ao púrpura intenso sobre um fundo azul de intensidade de cor variável. Entretanto os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida, mostrando intensidade de cor variável. Essa variabilidade de coloração deixa de ser um problema nas infecções maciças, porque sempre serão observados vários oocistos corados. Foram relatados casos em que todos os oocistos presentes no esfregaço fecal não foram corados^{1,27,37}. Os oocistos em preparações coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen são uniformes no tamanho, permanecendo com a mesma grandeza como foram descritos no exame direto a fresco. Entretanto com mais frequência do que nas preparações a fresco, os oocistos não são perfeitamente arredondados. A parede dos oocistos apresenta uma típica aparência rugosa ou ondulada e colapso ou distorção em um ou em vários lados^{27,37}. Dependendo do grau de coloração, os oocistos podem variar em cor, desde organismos incolores ou de coloração vermelho clara, a uma intensa e brilhante coloração púrpura avermelhado. Essa variabilidade na intensidade de coloração, ape-

sar de ser uma das características da *Cyclospora*, tem indubitavelmente levado a muitos erros no diagnóstico de laboratório¹⁷. Na coloração pela hematoxilina férrica modificada pela incorporação do corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenica-da), os oocistos da *Cycl. cayetanensis* aparecem arredondados, de coloração rosa a vermelho-púrpura sobre um fundo cinza da preparação^{67,68}.

A demonstração dos oocistos pelo exame direto a fresco é aumentada ou intensificada pela microscopia de epifluorescência^{7,8}. Os oocistos exibem marcada autofluores-

cência, a qual é facilmente observada pelo microscopista. A autofluorescência dos oocistos de *C. parvum* é tão tênue, que não exibe valor no diagnóstico desse coccídio. Entretanto, os oocistos de *I. belli* apresentam uma brilhante e visível autofluorescência^{1,8,37,73}. Os oocistos da *Cyclospora* autofluorescem em verde forte (filtro de excitação de 450 a 490 DM) ou em azul intenso (filtro de excitação de 365 DM) quando submetidos à ação da luz ultravioleta (UV). A fluorescência inespecífica é reduzida pela adição de uma gota de solução de iodo de D' Antoni antes do exame. As amostras fecais frescas fixadas pelo álcool metílico ou preservadas pelo SAF são usadas na microscopia de fluorescência pela luz ultravioleta (UV).

Os oocistos não se coram pelo tricrômico, mas aparecem como esferas torcidas, claras, pálidas e arredondadas. Também não se coram pela hematoxilina férrica, Grocott-Gomori, prata metamina, iodo ou ácido periódico de Schiff (PAS)³⁷.

Isospora belli

A infecção pela *I. belli* ou isosporose tem sido diagnosticada em pacientes com SIDA/AIDS. Os sintomas incluem diarreia, náuseas, febre, dor de cabeça e perda de peso. A doença pode persistir por meses ou anos. Em preparações fixadas e coradas, o oocisto é tipicamente elipsóide, medindo em média 20 a 30µm de comprimento e 10 a 19µm de largura (Tabela 1), com as extremidades afuniladas (regiões polares), apresentando uma dupla parede lisa e hialina. Quando excretados nas fezes, os oocistos são imaturos (não esporulados) contendo um esporoblasto. Os oocistos maduros depois da excreção se dividem formando dois esporoblastos. Os esporoblastos segregam cada qual uma membrana resistente em torno de si, transformando-se em esporocistos, com quatro esporozoítos dentro de cada um.

Os oocistos da *I. belli* são diagnosticados pelo exame direto a fresco, pela coloração de preparações fixadas e coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen, pela microscopia de contraste diferencial de interferência

TABELA 2
Microsporídios intestinais:
estágio de diagnóstico, forma, número de túbulo polar e tamanho

Espécies	Estágio de diagnóstico	Forma	Número de túbulo polar	Tamanho (µm)
<i>Enterocytozoon bieneusi</i>	Esporo	Esférico ou oval	4-7	0,8 x 1,5
<i>Encephalitozoon intestinalis</i>	Esporo	Esférico ou oval	4-7	1,2 x 2,0

(DIC ou Nomarsky) e pela epifluorescência. Os oocistos autofluorescem em azul intenso (filtro de excitação de 330 a 380 DM) quando submetidos à ação da luz ultravioleta (UV)^{7,37}

Microsporídios

Os microsporídios que parasitam o homem pertencem ao filo Microsporidia e à ordem Microsporida⁴⁶. Nesse filo estão classificados mais de 100 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies¹². Esses organismos são parasitos intracelulares obrigatórios dos vertebrados e invertebrados, caracterizados pela produção de esporos e pela presença do túbulo polar. A infecção da célula hospedeira se inicia quando um estímulo apropriado determina a expulsão do filamento tubular caudal, o qual penetra na membrana da célula hospedeira, permitindo a libertação do esporoplasma no interior da célula²³. As fases subsequentes da reprodução e da formação dos esporos termina com a ruptura da célula hospedeira e a libertação dos esporos⁶⁵.

As infecções humanas são adquiridas pela ingestão de pequenos esporos ovóides^{12,45,77}. Os microsporídios infectam insetos, peixes e mamíferos^{32,33,42,45}. Antes de 1985 o relato de casos de microsporidiose humana eram extremamente raros. Atualmente existe uma emergente evidência da ligação dos microsporídios com as doenças em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e de sua seqüela, a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA/AIDS)^{26,42,55,64,65}. O *Enterocytozoon bieneusi* foi descrito por Desportes *et al.* (1985). Esse organismo produz um pequeno esporo (0,8 x 1,5µm) e se constitui no mais importante agente de diarreia em pacientes sidéticos (Tabela 2).

Estima-se que o *E. bieneusi* pode ser a causa de 6,5 a 27% de todas as diarreias crônicas nesses pacientes. Estudos subsequentes mostraram que o *Enterocytozoon bieneusi* pode colonizar além dos enterócitos do intestino delgado, o epitélio do canal biliar e do pulmão⁶⁵. Em 1993, Cali, Kotler, and Orenstein¹⁴ descreveram a *Septata intestinalis* como um novo gênero e nova espécie. Hartskeerl *et al.*³⁹ reclassificaram esse microsporídio para o gênero *Encephalitozoon*, passando a ser descrito como *Encephalitozoon intestinalis*. Oito gêneros de microsporídios estão relacionados com essas infecções, mas somente as espécies *Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon intestinalis* permanecem como parasitas intestinais, apesar de a *En-*

cephalitozoon intestinalis se disseminar através de outros tecidos^{9,13,42,72}. Os outros três gêneros (*Nosema*, *Encephalitozoon* e *Pleistophora*) são encontrados em vários tecidos^{42,45}. Os espécimes nos quais os microsporídios são diagnosticados incluem: urina, escarro, lavagem broncoalveolar, líquido biliar, aspirado duodenal e fezes. Os organismos são também identificados em coletas e raspagens de tecidos da mucosa sinovial, córnea, conjuntiva e secreção nasal, além de biópsias traqueobronquial, do intestino delgado, da bexiga, do seio paranasal, do fígado, dos músculos e em colecistectomia¹².

O diagnóstico da microsporidiose intestinal, (*Enterocytozoon bieneusi* e *Encephalitozoon intestinalis*) é realizado pela detecção dos esporos. A determinação da espécie causal dessa parasitose, com frequência, é realizada pela microscopia eletrônica, dependendo desta maneira de procedimentos invadidos (amostras de biópsia ou de autópsia). A maioria dos corantes histológicos não coram os microsporídios¹³. Os microsporídios apesar de estarem localizados nos tecidos, não provocam uma resposta inflamatória importante, podendo os mesmos passarem despercebidos no exame das amostras histológicas⁶⁹.

No diagnóstico da microsporidiose intestinal os esporos podem ser detectados nas fezes, mas seu pequeno tamanho e sua similaridade com pequenas bactérias, tornaram a visualização dos esporos uma tarefa muito difícil. As amostras e os procedimentos usados para a coloração e identificação desses organismos são:

- tecidos de biópsias: métodos derivados de Ziehl-Neelsen, Giemsa, prata-metenamina, ácido periódico de Schiff (PAS) e hematoxilina-eosina (HS), além da microscopia eletrônica.
- fezes: método do tricrômico modificado e microscopia eletrônica^{12,33,37,42,52,73}.

Entre os procedimentos descritos para detectar esporos de microsporídios incluem-se os métodos de Giemsa, azul de toluidina, Gram, ácido periódico de Schiff, *chromotrope* 2R e suas modificações^{34,44,51,52,65,77}. Também são usados para a detecção dos esporos agentes quimiofluorescentes^{74,77} e anticorpos mono e policlonais^{69,75,80}. O método modificado do tricrômico de Weber *et al.*^{77,78} fornece características diferenciais da coloração dos esporos, as quais facilitam a detecção dos microsporídios nas fezes e nos líquidos orgânicos, tornando-se o método padrão de coloração. Algumas modificações foram incluídas ao procedimento padrão de Weber⁷⁷.

Ryan *et al.*⁶⁵ descreveram que a redução da quantidade do ácido fosfotúngstico e a substituição da anilina azul pelo *fast green* na coloração original resultou em um melhor contraste dos esporos com o fundo da coloração mais claro. Kokoskin *et al.*⁴⁴ descreveram que 10 minutos de exposição para o *chromotrope* 2R, co-

rante chave no método de Weber, a 50°C não era suficiente para a visualização dos esporos, como também a redução do tempo total de coloração do procedimento de 120 para 40 minutos.

Os esporos são resistentes e não se coram satisfatoriamente pela hematoxilina férrica, são ocasionalmente ácido resistentes à fucsina-fênica e quando corados pelo ácido periódico de Schiff (PAS-positivo) apresentam um grânulo polar na extremidade anterior^{13,33,34,37}. Os esporos dos microsporídios têm uma evidente afinidade para a coloração de Gram^{51,52}. A coloração de Gram-*Chromotrope* tem sido usada para a detecção de esporos de microsporídios em amostras clínicas (fezes, urina, escarro, saliva e sobrenadante de cultura de células^{51,52,75}). Moura *et al.*^{51,52,75} descreveram um novo e excelente procedimento para a coloração de esporos de microsporídios em amostras clínicas, independente da origem, pela combinação da coloração de Gram com o método de Weber. Os estágios de diagnóstico (esporos) são muito pequenos (1 a 4µm), mas são visíveis em cortes histológicos e em espécimes fecais, quando corados por diferentes corantes e observados pela microscopia óptica. A identificação verdadeira das espécies pode depender da microscopia eletrônica, dos anticorpos fluorescentes ou da reação em cadeia da polimerase (PCR).

Apêndice

Coccídios

***Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* e *Isospora belli*: exame direto a fresco e esfregaços permanentes corados**

Os oocistos e os esporocistos são transparentes e de difícil visualização em esfregaços não corados e somente são identificados através de colorações específicas. Devido às limitações do exame microscópico de preparações a fresco, vários métodos de coloração favorecem o diagnóstico dos oocistos dos coccídios. Essas preparações proporcionam ao parasitologista um registro permanente do protozoário identificado, podendo ser usadas para estudos com especialistas quando forem observadas características morfológicas que diferem das comuns. Existem vários procedimentos de coloração. Em geral, as melhores colorações são aquelas em que o parasito é corado pelas variações da coloração de Ziehl-Neelsen.

Cryptosporidium parvum

Exame direto a fresco: Os oocistos se apresentam como uma estrutura geralmente esférica de 3 a 6µm de diâmetro (média 4 a 5µm), com membrana externa fina e citoplasma finamente granulado. A mancha negra proeminente, central ou lateral, representa os corpos residuais. Os quatro esporozoítos livres aparecem

como pequenas manchas dispostas na periferia em forma de “C”. O núcleo é visto no centro do organismo.

Esfregaços permanentes corados: Os oocistos aparecem arredondados, com 3 a 5µm, de coloração do rosa ao vermelho e ao púrpura intenso, com uma zona clara entre os esporocistos corados e a parede do oocisto. Alguns dos 4 esporozoítos podem ser vistos. O fundo da preparação é corada em azul. A parede é espessa, o citoplasma é finamente granulado com uma zona central clara. Os corpos residuais e os esporozoítos são corados em castanho. As leveduras e as bactérias aparecem uniformemente coradas em azul. Os organismos presentes frequentemente apresentam, entre eles, uma intensidade de cor variável.

Cyclospora cayetanensis

Exame direto a fresco: Os oocistos não são esporulados quando excretados nas fezes, pois necessitam de uma a duas semanas em condições ideais de temperatura para se tornarem esporulados. Os oocistos esporulados são arredondados, com 8 a 9µm de diâmetro (variando de 8 a 10µm). Cada oocisto esporulado possui dois esporocistos ovais (4,0 x 6,3µm), e cada esporocisto apresenta dois esporozoítos (1,2 x 9,0µm). Os oocistos possuem uma evidente e bem definida parede cística. Os oocistos mostram internamente agrupamentos de glóbulos refráteis, rodeados por uma membrana espessa. Esses glóbulos internos coram-se de castanho pela solução de iodo. Os oocistos da *Cyclospora* são duas vezes maiores em tamanho do que os estágios de diagnóstico do *C. parvum* (arredondados, esféricos ou ovais, com 4 a 5µm de diâmetro) e um terço menores do que a *I. belli* (elipsóides, 20 a 30 x 10 a 19µm). A morfometria com o micrômetro ocular é indispensável para a identificação das espécies.

Esfregaços permanentes corados: Curiosa e inexplicavelmente, a *Cyclospora* exhibe uma marcada variabilidade de coloração quando corada pelos derivados de Ziehl-Neelsen. Os oocistos coram-se do rosa ao vermelho e ao púrpura intenso sobre um fundo azul de intensidade variável. Entretanto os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida, mostrando intensidade variável de cor. Essa variabilidade de coloração deixa de ser um problema nas infecções maciças, porque sempre serão observados vários oocistos corados. Foram relatados casos em que todos os oocistos presentes no esfregaço fecal não foram corados. Os oocistos em preparações coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen são uniformes no tamanho, permanecendo com a mesma grandeza como foram descritos no exame direto a fresco. Entretanto, com mais frequência do que nas preparações a fresco, os oocistos não são perfeitamente arredondados. A parede dos oocistos apresenta uma típica aparência rugosa ou ondulada e colapso ou distorção em um ou em vários lados. Dependendo do grau de coloração, os oocistos

podem variar em cor, desde organismos incolores ou de coloração vermelho-clara, a uma intensa e brilhante púrpura avermelhado. Essa variabilidade na intensidade de coloração, apesar de ser uma das características da *Cyclospora*, tem indubitavelmente levado a muitos erros no diagnóstico de laboratório. Na coloração da hematoxilina férrica modificada pela incorporação do corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenica), os oocistos da *Cycl. cayetanensis* aparecem arredondados com coloração de rosa a vermelho-púrpura, sobre um fundo cinza da preparação

Isospora belli

Exame direto a fresco: Quando excretados nas fezes, os oocistos são imaturos (não esporulados) contendo um esporoblasto. Os oocistos maduros depois da excreção se dividem formando dois esporoblastos. Os esporoblastos segregam cada qual uma membrana resistente em torno de si, transformando-se em esporocistos, com quatro esporozoítos dentro de cada um. Os oocistos da *I. belli* medem em média 20 a 30µm de comprimento e 10 a 19µm de largura, com as extremidades afuniladas (regiões polares).

Esfregaços permanentes corados: Em preparações fixadas e coradas, o oocisto é tipicamente elipsóide, apresentando uma dupla parede lisa e hialina. Quando corado pelos derivados de Ziehl-Neelsen a *I. belli* apresenta coloração de rosa ao vermelho e ao púrpura intenso. Os oocistos imaturos aparecem corados, enquanto que os oocistos maduros mostram os dois esporocistos corados, usualmente de rosa a púrpura, com uma zona clara entre os esporocistos corados e a parede do oocisto. O fundo da preparação é corada em azul.^{32,33}

Método de coloração para coccídios

Método modificado da safranina (à quente)

O método modificado da safranina (à quente) é indicado para a coloração da *Cycl. cayetanensis*, *C. parvum* e *I. belli*. Os oocistos da *Cyclospora* em amostras clínicas são rotineiramente demonstrados pelo método modificado de Kinyoun. Entretanto, os oocistos corados por esse método apresentam uma variabilidade de coloração desde organismos não corados a totalmente corados, podendo conduzir a uma possível falsa identificação. O método modificado da safranina produz uma coloração uniforme dos oocistos. O corante deve ser aquecido até ferver, usando placa de aquecimento (*slide warmer*).

Amostra

Material fecal não preservado, fezes frescas ou sedimento concentrado de fezes frescas ou fezes preservadas em solução salina de formaldeído a 10%.

Reagentes

1. Álcool metílico (CH₄O)
2. Ácido clorídrico (HCl)
3. Safranina (CI 50240- Sigma) (C₂₀H₁₉N₄Cl)
4. Verde de malaquita (CI 42000) (C₂₃H₂₅N₂)₂·3H₂C₂O₄)
5. Resina sintética (*Cytoseal* 60, Mounting Medium, Low Viscosity)

Preparação das soluções

1. Solução aquosa de safranina a 1% (m/v)

- Armazenar à temperatura ambiente.
Estável por 1 ano.

2. Solução aquosa de verde de malaquita a 3% (m/v)

- Armazenar à temperatura ambiente.
Estável por 1 ano.

3. Solução ácido-álcool

Ácido clorídrico 3 ml
Álcool metílico 97 ml

Coloração da amostra

1. Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
2. Preparar o esfregaço com 1 a 2 gotas de fezes frescas ou preservadas. Deixar secar à temperatura de 60°C em aquecedor de lâmina (*slide warmer*). Não preparar esfregaços espessos.
3. Fixar com ácido-álcool por 3 a 5 minutos.
4. Lavar rapidamente com água destilada e drenar.
5. Corar com a safranina a 1% por 1 minuto. Aquecer o esfregaço em aquecedor de lâmina (*slide warmer*) até a emissão de vapores; não deixar secar o corante.
6. Lavar rapidamente com água destilada e drenar.
7. Corar o fundo com solução de verde de malaquita a 3% por 2 minutos.
8. Lavar com água destilada. Secar o esfregaço e montar com resina sintética (*Cytoseal* 60).
9. Examinar 200 a 300 campos do esfregaço com objetiva de imersão (100X).

Observação

Cubas de *Coplin* devem ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

Características da coloração

Os oocistos aparecem arredondados, corados em um brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo uniformemente corado em verde.

Controle de qualidade

Incluir junto ao método de coloração uma lâmina controle com *C. parvum*, preparada com amostra fecal preservada pela solução salina de formaldeído a 10%. Os oocistos aparecem arredondados corados em um brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo uniformemente corado em verde.

Método de coloração para microsporídios

Coloração Gram-Chromotrope

Em 1996 Moura *et al.* desenvolveram o método do Gram-Chromotrope para microsporídios, que é uma combinação da coloração de Gram com a coloração modificada do tricrômico.

Amostra

Espécimes: fezes, urina, escarro, saliva, sobrenadante de cultura de células

Reagentes

1. Chromotrope 2R (CI 16570) ($C_{16}H_{10}N_2Na_2O_8S_2$)
2. Fast green (CI 42053) ($C_{37}H_{34}N_2Na_2O_{10}S_3$)
3. Ácido fosfotúngstico ($24W0_3 \cdot 2H_3P0_4 \cdot 48H_2O$)
4. Ácido acético glacial ($C_2H_4O_2$)
5. Acetona (C_3H_6O)
6. Álcool metílico (CH_4O)
7. Álcool etílico absoluto (C_2H_6O)
8. Éter etílico a 95% ($C_4H_{10}O$)
9. Cristal violeta (Bacto Crystal violet) (CI 42555) ($C_{25}H_{30}ClN_3$)
10. Hidrogenocarbonato de sódio ($NaHCO_3$)
11. Iodo, cristais (I_2)
12. Iodeto de potássio (KI)
13. Resina sintética (Cytoseal 60-Stephens Scientific)

Preparação das soluções

1. Solução de cristal violeta

Cristal violeta 1,0 g
Água destilada-deionizada 100,0 ml

- Colocar o cristal violeta em um gral e acrescentar lentamente a água. Deixar em repouso durante 24 horas e filtrar.

2. Solução de Hidrogenocarbonato de sódio a 5% (m/v)

Hidrogenocarbonato de sódio .. 1,0 g
Água destilada-deionizada 20,0 ml

- Dissolver hidrogenocarbonato de sódio em água. Filtrar e estocar em frasco conta-gotas.

3. Solução de Lugol

Iodo (I_2) 1,0 g
Iodeto de potássio (IK) 2,0 g
Água destilada-deionizada 300,0 ml

- Dissolver o iodeto de potássio em água. Adicionar lentamente o iodo e agitar a mistura até a completa dissolução. Filtrar e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada, ao abrigo da luz.

4. Solução ácido-álcool (v/v)

Álcool etílico a 95% 995,5 ml
Ácido acético 4,5 ml

- Adicionar o ácido acético ao álcool etílico e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

5. Solução de éter etílico-acetona (v/v)

Acetona 75 ml
Éter etílico 25 ml

- Misturar o álcool etílico a 95° e a acetona e estocar em frasco de cor âmbar com tampa esmerilhada. Conservação indefinida.

6. Solução de Chromotrope

Chromotrope 2R 6,0 g
Fast green 0,15 g
Ácido fosfotúngstico 0,7 g
Ácido acético glacial 3 ml
Água destilada-deionizada 100 ml

- Colocar os ingredientes secos em um "beaker" e adicionar 3 ml de ácido acético glacial, Agitar a mistura e deixar em repouso 30 minutos para amadurecer. Adicionar 100 ml de água. O corante é estável e não deve ser diluído.

Coloração da amostra

- A) Usar luvas durante todas as etapas da coloração.
- B) Preparar um esfregaço delgado estirado (1 a 2 gotas) com a amostra que deve ser corada. Deixar secar à temperatura ambiente.
- C) Fixar o esfregaço pelo calor em chama baixa (3 vezes por 1 segundo) ou 5 minutos no aquecedor de lâmina (slide warmer) à temperatura de 60°C. Deixar esfriar à temperatura ambiente. O esfregaço pode ser fixado com álcool metílico por 3 a 5 minutos.
- D) Coloração pelo método de Gram
 1. Cobrir o esfregaço durante 2 minutos com a solução corante de cristal violeta a 1%, com a adição de 3 gotas de solução de hidrogenocarbonato de sódio a 5%.
 2. Escorrer o excesso do corante e lavar com água corrente.
 3. Imergir o esfregaço na solução de iodo de Gram por 2 minutos.
 4. Escorrer o excesso da solução de iodo de Gram e lavar com água corrente.
 5. Diferenciar com a solução de acetona-éter etílico.
 6. Lavar com água corrente.
- E) Coloração pela solução corante do Chromotrope
 1. Imergir o esfregaço na solução corante de Chromotrope por 10 minutos
 2. Imergir na solução de álcool-ácido por 1 a 3 minutos.

3. Lavar com álcool etílico a 95% por 1 minuto.
4. Lavar duas vezes, 1 minuto cada uma, com álcool etílico a 100%.
5. Deixar secar à temperatura ambiente ou no aquecedor de lâmina (*slide warmer*) por 5 minutos. Montar com resina sintética.
6. Examinar 200 a 300 campos do esfregaço com objetiva de imersão (100X)

Observação

Cubas de *Coplin* devem ser usadas em todas as etapas do procedimento de coloração.

Características da coloração

A parede dos esporos dos microsporídios apresenta coloração do rosa pálido ao vermelho. As bactérias, células de leveduras e alguns artefatos se coram de verde desmaiado.

Controle de qualidade

1. A única maneira de realizar o controle de qualidade (CQ) aceitável para esse método é usar esporos verdadeiros como controle dos organismos. O uso dos microrganismos é particularmente importante porque os esporos são dificilmente corados e muito pequenos (1 a 1,5 µm).
2. Os esfregaços para o CQ devem ser incluídos em todos os procedimentos de coloração, particularmente quando não são realizadas colorações com frequência.
3. Dependendo do número de esfregaços corados, não mais de 10 lâminas, as soluções subsequentes à solução corante do *Chromotrope* devem ser trocadas para a obtenção de uma adequada lavagem e/ou desidratação
4. Quando os esfregaços forem corretamente fixados e corados, os esporos aparecem ovóides e refráteis, com a parede corada do rosa ao vermelho, com uma zona central clara ou eventualmente mostrando uma faixa horizontal ou diagonal, a qual representa o túbulo polar.
5. Usar no procedimento de coloração cubas de *Coplin* para evitar a evaporação das soluções.

REFERÊNCIAS

1. Ash, L.R. & Orihel, T.C. *Atlas of human parasitology*. American Society of Clinical Pathologists, Chicago. 1997.
2. Ashford, R.W. Occurrence of a undescribed coccidian in man in Papu New Guinea. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73:479-500, 1979
3. Asahi, H., Kumada, M., Kato, K. & Komyama, T. A. simple staining method for cryptosporidian oocysts and sporozoites. *Jap. J. Med. Sci. Biol.* 41:117-121, 1988.
4. Baxby, D., Getty, B., Blundell, N. & Ratcliffe, S. Recognition of whole *Cryptosporidium* oocysts in feces by negative staining and electron microscopy. *J. Clin. Microbiol.* 19:566-567, 1984.
5. Baxby, D., Blundell, N. & Hart, C. The development and performance of a simple sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in feces. *J. Hyg.* 93:317-323, 1994.
6. Berlin, O.G.W., Novak, S.M., Porschen, R.K., Long, E.G., Stelma, G.N. & Schaeffer F.W. III. Recovery of *Cyclospora* organisms from patients with prolonged diarrhea. *Clin. Infect. Dis.* 18:606-609, 1994.
7. Berlin, O.G.W., Conteas, C.N. & Sowerby, T.M. Detection of *Isospora* in the stools of AIDS patients using a new rapid autofluorescence technique. *AIDS.* 10:442-443, 1996.
8. Berlin, O.G.W., Peter, J.B., Gagne C., Conteas, C.N. & Ash, L.R. Autofluorescence and detection of *Cyclospora* oocysts. *Emerg. Inf. Dis.* 4:127-128, 1998.
9. Blanshard, C., Hollister, W.S., Peacock, C.S., Tovey, D.G., Ellis, D.S., Cannig, E.U. & B., Gazzard, G. Simultaneous infection with two types of intestinal microsporidia in a patient with AIDS. *Gut* 33:418-420, 1992.
10. Bronsdon, M.A. Rapid dimethyl sulfoxide-modified acid-fast stain of *Cryptosporidium* oocysts in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 19:952-953, 1984.
11. Bryan, R.T., Cali, A., Owen, R.I. & Spencer, H.C. Opportunistic pathogens in patients with AIDS. p. 1-26. In T. Sun (ed.), *Progress in Clinical Parasitology*, vol 2. Field, and Wood. Philadelphia, 1991.
12. Bryan, R.T. Microsporidia, p. 2513-2524. In Mandell, G.L.; J.E. Bennett, and R. Dolin (eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th ed. Churchill Livingstone, New York, 1995.
13. Cali, A. & Owen, R. Microsporidiosis, p. 929-950. In A. Ballows (ed.), *Laboratory Diagnosis of Infectious Diseases: Principles and Practice*. Springer Verlag, New York. 1988.
14. Cali, A., Kotler, D.P. & Orenstein, J.M. *Septata intestinalis* n.g., n.sp., an intestinal microsporidian associated with chronic diarrhea and dissemination in AIDS. *J. Eukaryot. Microbiol.* 40:101-112, 1993.
15. Chichino, G., Bruno, A., Cevini, C., Atzori, C., Gatti, S. & Scaglia, M. New rapid staining methods of *Cryptosporidium* oocysts in stools. *J. Protozool.* 38(Suppl):212S-214S, 1991.
16. Clarke, S.C. Laboratory diagnosis and autofluorescence of *Cyclospora*. *Br. J. Biomed. Sci.* 52:231, 1996.
17. Clarke, S.C. & McTibtyre, M. Incidental laboratory diagnosis of *Cyclospora cayetanensis*. *Br. J. Biomed. Sci.* 53:243, 1996.
18. Collins, R. Protozoan parasites of the intestinal tract: A review of coccidia and microsporidia. *JAOA* 97:593-598, 1997.
19. Current, W.L. Human cryptosporidiosis. *N. Engl. J. Med.* 309:1326-1327, 1983.
20. De Carli, G.A. & Saraiva, P.J. Diagnóstico de laboratório da criptosporidiose humana. *Rev. Bras. Anál. Clín.* 23:26-30, 1991.
21. De Carli, G.A. *Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas. Métodos e Técnicas*. MEDSI, Rio de Janeiro. 1994.
22. De Carli, G.A. Identificação de coccídios intestinais: modificações ao método de Ziehl-Neelsen. *RBAC* 27:83-87, 1995.
23. De Carli, G.A., Saraiva, P.J. & Issler, R.M.S. Infecções parasitárias e o hospedeiro imunocomprometido: diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses. *RBAC* 29:24-28, 1997.
24. De Carli, G.A. *Parasitologia Clínica: Diagnóstico de Laboratório dos Coccídios e Microsporídios Intestinais*. Editora EDIPUCES, Porto Alegre, 2000.
25. Deluol, A.M., Cenac, J., Matheron, S., Marche, C. & Savel, J. La cryptosporidiose. II. Diagnostic biologique. *Ann. Biol. Clin.* 42:399-405, 1984.
26. Desportes, I., Charpentier, Y., Gakian, A., Bernard, F., Cochand-Prioleet, B., Lavergne, A., Ravisse, P. & Modigliani, R. Occurrence of a new microsporidian: *Enterocytozoon bienersi* n.g., n.sp., in the enterocytes of a human patient with AIDS. *J. Protozool.* 32:250-254, 1985.
27. Eberhard, M.L., Pieniazek, N.J. & Arrowood, M.J. Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 212:792-797, 1997.
28. Eimer, T. Ueber die ei- und kugelförmigen sogenannten Psorospermien der Wirbelthiere, p.1-58. Würzburg: A. Stuber's Verlagshandlung. 1870.
29. Fayer R & Ugar, B.L.P. *Cryptosporidium* spp., and cryptosporidiosis. *Microbiol. Rev.* 50:458-483, 1986.
30. Garcia, L.S., Brewer, T.C. & Bruckner, D.A. A comparison of the formalin-ether concentration and trichrome-stained smear methods for the recovery and identification of intestinal protozoa. *Am. J. Med. Tech.* 45: 932-935, 1979.
31. Garcia, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C. & Shimizu, R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* stool specimen. *J. Clin. Microbiol.* 18:185-190, 1983.
32. Garcia, L.S. & Shimizu, R.Y. Diagnostic parasitology: An overview of topics. *Lab. Med.* 24:13-18, 1993.
33. Garcia, L.S. & Shimizu, R.Y. Diagnostic parasitology: Parasitic infections and the compromised host. *Lab. Med.* 24:205-215, 1993.
34. Garcia, L.S., Shimizu R.Y. & Bruckner, D.A. Detection of microsporidian spores in fecal specimens from patients diagnosed with cryptosporidiosis. *J. Clin. Microbiol.* 32:1739-1741, 1994.
35. Garcia, L.S. Laboratory methods for diagnosis of parasitic infections. p.

- 776-861. In E.J. Baron, L.R. Peterson & S.M. Finelgold (eds.), *Bailey, and Scott's Diagnostic Microbiology*. Mosby, St. Louis. 1994.
36. Garcia, L.S., Bullock-Iacullo, S., Palmer, J. & Shimizu, R.Y. Diagnosis of parasitic infections: collections, processing and examination of specimens. p 1145-1158. In P.R. Murray (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1995.
 37. Garcia, L.S. & Bruckner, D.A. *Diagnostic Medical Parasitology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1997.
 38. González-Ruiz, A. & Bendall, D.R.P. Size Matters: The use of the ocular micrometer in diagnostic parasitology. *Parasitol. Today* 11:83-85, 1995.
 39. Hartskeerl, R.A., Van Gool, T., Schuitema, A.R., Didier, E.S. & Terpsstra, W.J. Genetic and immunological characterisation of the microsporidian *Septata intestinalis* Cali, Kotler and Orenstein, 1993: reclassification to *Encephalitozoon intestinalis*. *Parasitology* 110:277-285, 1995.
 40. Hafiz, D.R.C., Spencer, M., Lee, M., Gooch, H. & Duerden, B.I. Use of microwave for acid and alcohol fast staining. *J. Clin. Pathol.* 38:1073-1076, 1985.
 41. Kageruka, P., Brandt, J.R.A., Taelman, H. & Jonas, C. Modified koster staining method for the diagnosis of cryptosporidiosis. *Ann. Soc. Belge. Med. Trop.* 64:171-175, 1984.
 42. Healy, G.R. & Garcia, L.S. Intestinal and urogenital protozoa. p.1204-1228. In Murray, P.R., M.A. Baron, F.C. Tenover and R.H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. ASM Press, Washington, DC. 1995.
 43. Heine, V.J. & Boch, J. Kryptosporidien-infektionem beim Kalb Nachweis, vorkommen und experimentelle Übertragung. *Berl. Muench. Tierärztl. Wochenschr.* 94:289-292, 1981.
 44. Kokoskin, E., Gyorkos, T.W., Camus, A., Cedilotte, L., Purtil, T. & Ward, B. Modified technique for efficient detection of microsporidia. *J. Clin. Microbiol.* 32:1974-1975, 1994.
 45. Leitch, G.J., Visvesvara, G.S. & He, Q. Inhibition of microsporidian spore germination. *Parasitol. Today* 9:422-424, 1993.
 46. Levine, N., Corliss, J.O., Cox, F.E.G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B.M., Leedale, G.F., Loeblich III, A.R., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E.G., Page, F.C., Poljansky, G., Sprague, V., Vavra, J. & Wallace, F.G. A newly revised classification of the protozoa. *J. Protozool.* 27:37-58, 1980.
 47. Ma, P. & Soave, R. Three-step stool examination for cryptosporidiosis in 10 homosexual men with protracted watery diarrhea. *J. Infect. Dis.* 147:824-828, 1983.
 48. Ma, P. *Cryptosporidium*-Biology and diagnosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* 202:135, 1986.
 49. Milacek, P. & J. Vitovec, J. Differential staining of cryptosporidia by aniline-carbolmethyl violet and tartazine in smears from feces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 32:50, 1985.
 50. Miller, J.M. Quality control of media, reagents, and stains. p.1203-1225. In A. Ballows, W.J. Hausler Jr, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. ASM Press, Washington, D.C. 1991.
 51. Moura, H., Nunes da Silva, J.L., Sodré, F., Brasil, C.P., Wallmo, K., Wahlquist, S., Wallace, S., Croppo, G.P. & Visvesvara, G.S. Gram-chromotrope: a new technique that enhances detection of microsporidian spores in clinical samples. *J. Euk. Microbiol.* 43:954-955, 1996.
 52. Moura, H., Schwartz, D.A., Bornay-Llinares, F., Sodré, F.C., Wallace, S. & Visvesvara, G.S. A new and improved "quick-hot Gram-chromotrope technique that differentially stains microsporidian spores in clinical samples, including paraffin-embedded tissue sections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 211:888-893, 1997.
 53. Murray P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, F.C. & Tenover, R.H. 1995. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1995.
 54. Narango, J. et al. *Cryptosporidium muris*-like objects from fecal samples of Peruvians. Abstract 342. In *Proceedings of the 38th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, Honolulu. Allen Press, Lawrence. 1989.
 55. Orenstein, J.M., Dieterich, T. & Kolter, D.P. Systemic dissemination by a new recognized intestinal microsporidia species in AIDS. *AIDS* 6:1143-1150, 1992.
 56. Ortega, Y.R., Sterling, C.R., Marshall, M.M. & Gilman, R.H. *Cyclospora cayetanensis*: a new protozoan pathogen of humans. Abstract 289. In: *Proceedings of the 41st Annual Meeting of the American Society for Tropical Medicine and Hygiene*, 1992.
 57. Ortega, Y.R., Sterling, C.R., Gilman, R.H., Gama, V.A. & Diaz, F. *Cyclospora* species – a new protozoan pathogen of humans. *N. Engl. J. Med.* 328:1308-1312, 1993.
 58. Ortega, Y.R., Gilman, R.H. & Sterling, C.R. A new coccidian parasite (Apicomplexa:Eimeridae) from humans. *J. Parasitol.* 80:625-629, 1994.
 59. Ortega, Y.R., Sterling, C.R. & Gilman, R.H. *Cyclospora cayetanensis*. *Adv. Parasitol.* 40:399-418, 1998.
 60. Palmer, J. Modified iron hematoxylin/Kinyoun stain. *Clin. Microbiol. News*, 13:39-40, 1991. (Letter)
 61. Pieniazek N.J., Slemenda, S.B., da Silva, A.J., E.M. Alfano, E.M. & Arrowood, M.J. PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2:342-343, 1996.
 62. Pohjola, S. Negative staining method with nigrosin for the detection of cryptosporidial oocysts - a comparative study. *Res. Vet. Sci.* 36:217-219, 1994.
 63. Pohjola, S., Jokipii, L. & Jokipii, A. Dimethyl-sulphoxide-Ziehl-Neelsen technique for detection of cryptosporidial oocysts. *Vet. Rec.* 115:442-443, 1985.
 64. Pol, S., Romana, C.A., Richard, S., Amouyal, P., Desportes-Livage, I., Carnot, F., Pays, J. & Berthelot, P. Microsporidia infection in patients with the human immunodeficiency virus and unexplained cholangitis. *N. Engl. J. Med.* 328:95-99, 1993.
 65. Ryan, N.J., Sutherland, G., Coughlan, K., Globan, M., Doultree, J., Marshall, J., Baird, R.W., Pedersen, J. & Dwyer, B. A new trichrome-blue stain for detection of microsporidian species in urine, stool, and nasopharyngeal specimens. *J. Clin. Microbiol.* 31:3264-3269, 1993.
 66. Schneider, A. Sur les psorospermies oviformes ou coccidies, espèces nouvelles ou oeu connues. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 9:387-404, 1881.
 67. Shimizu, R.Y. Special stains for coccidia and cyanobacterium-like bodies: Modified Kinyoun's acid-fast stain (cold). p. 7.4.1.1-7.1.1.3 In H.D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*. vol.2. ASM Press, Washington, D.C. 1992.
 68. Shimizu R.Y. Special stains for *Cryptosporidium* spp. p 7.10.8.2-7.10.8.2 In: H.D. Isenberg (ed.), *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. American Society for Microbiology, Washington, DC. 1992.
 69. Schwartz, D.A., Bryan, R.T., Hewan-Lowe, H.O., Visvesvara, G.S., Weber, R., Calli, A. & Angritt, P. Dissemination microsporidiosis *Encephalitozoon heleni* and acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:660-668, 1992.
 70. Smith, W.J. & Barlett, M.S. Diagnostic parasitology: introduction and methods, p.701-716. In A. Ballows, W.J. Hausler Jr, K.L. Herrmann, H.D. Isenberg and H.J. Shadomy (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*, 5th ed. ASM Press, Washington, DC. 1991.
 71. Soave, R. *Cyclospora*. *Inf. Dis. Clin. North Amer.* 12:1-2, 1998.
 72. Sobottka, I., Albrecht, H., Schottelius, J., Visvesvara, G.S., Laufs, R. & Schwartz, D.A. Disseminated *Encephalitozoon (Septata) intestinalis* infection in a patient with AIDS: novel diagnostic approaches and autopsy-confirmed parasitological cure following with albendazole. *J. Clin. Microbiol.* 33:2948-2952, 1995.
 73. Terra, L., Pellicano, S. & Milano, M. Diagnosi di laboratorio delle micro-parassitosi intestinali in pazienti affetti da AIDS: stato dell'arte. *Minerva Med.* 89:23-27, 1998.
 74. Van Gool T., Canning, E.U. & Dankert, J. An improved practical and sensitive technique for the detection of microsporidian spores in stool samples. *J. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 88:189, 1994.
 75. Visvesvara, G.S., Leitch, G.J., Moura, H., Wallace, S. & Bryan, R.T. Culture, electron microscopy, and immunoblot studies on a microsporidian parasite isolated from the urine of a patient with AIDS. *J. Protozool.* 38:1055, 1991.
 76. Visvesvara, G.S., Moura, H., Kovacs-Nace, E., Wallace, S. & Eberhard, M.L. Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. *J. Clin. Microbiol.* 35:730-733, 1997.
 77. Weber, R., Bryan, R.T., Owen, R.L., Wilcox, C.M., Gorelkin, L., Visvesvara, G.S. and the Enteric opportunistic infections working group. Improved light-microscopical detection of microsporidia spores in stool and duodenal aspirates. *N. Engl. J. Med.* 326:161-166, 1992.
 78. Weber, R., Bryan, R.T., Schwartz, D.A. & Owen, R.I. Human microsporidian infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 7:426-461, 1994.
 79. Wheatley, W. 1951. A rapid staining procedure for intestinal amoebae and flagellates. *Am. J. Clin. Pathol.* 21:990-991, 1951.
 80. Ziert C.C., Gill, V.J. & Ziert, W.S. Detection of microsporidian spores in clinical samples by indirect fluorescent antibody assay using whole-cell antisera to *Encephalitozoon cuniculi* and *Encephalitozoon hellem*. *J. Clin. Microbiol.* 31:3071, 1993.

Endereço para correspondência

Prof. Geraldo Atílio De Carli
Av. Cel. Lucas de Oliveira, 597/302
Monte Serrat, Porto Alegre, RS, 90440-011
TeleFax: 051 332-2582
E-mail: gdecarli@portoweb.com.br

Beta-Lactamase de Espectro Estendido: definições, importância clínica e detecção laboratorial

Extended-Spectrum Beta-Lactamase: definitions, clinical relevance and laboratorial detection

Carlos Henrique Pessoa de Menezes e Silva*

RESUMO - Um mecanismo comum de resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos é a produção de beta-lactamases, que agem quebrando o anel beta-lactâmico das drogas derivadas da penicilina. O termo Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) refere-se às beta-lactamases produzidas principalmente por *Klebsiella spp.* e *Escherichia coli* que apresentam resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro, os quais normalmente possuem atividade contra os bacilos Gram-negativos. Exemplos são cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, aztreonam e cefpodoxima. As ESBL não são ativas contra as cefamicinas e são inibidas pelo ácido clavulânico. A prevalência de bactérias produtoras de ESBL na maioria dos hospitais continua desconhecida, apesar de vários trabalhos relatando surtos de infecção devido a estes organismos. A dificuldade na detecção da produção de ESBL utilizando testes de susceptibilidade rotineiros tem sido bem documentada. Os testes convencionais frequentemente são indicadores inadequados da produção de ESBL. Critérios de interpretação modificados para certos antibióticos ou o uso de testes especiais devem ser utilizados para aumentar a sensibilidade da detecção de ESBL. A falha no reconhecimento das cepas produtoras de ESBL resultam em uma terapia beta-lactâmica inadequada.

PALAVRAS-CHAVE - Beta-lactamase; enterobactérias; resistência antimicrobiana.

SUMMARY - A common mechanism of bacterial resistance to beta-lactam antibiotics is the production of beta-lactamase enzymes that break down the structural beta-lactam ring of penicillin-like drugs. The term Extended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) refers to beta-lactamase enzymes produced mainly by *Klebsiella spp.* and *Escherichia coli* that encode for resistance to broad-spectrum beta-lactam antibiotics that normally have activity against Gram-negative bacilli. Examples are cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, aztreonam and cefpodoxime. The ESBL are not active against the cephamycins, and are inhibited by clavulanic acid. The prevalence of ESBL-producing bacteria in most hospitals remains unknown in spite of numerous reports of nosocomial outbreaks of infection due to these organisms. Difficulty in the detection of ESBL production using routine antimicrobial susceptibility testing methods has been well documented. Conventional susceptibility tests are often inadequate indicators of ESBLs. Modified interpretive criteria for key antibiotics or the use of special tests should be used to increase the sensitivity of ESBL detection. Failure to recognise ESBL producing strains may not result in inappropriate beta-lactam therapy.

KEY WORDS - Beta-lactamase; Enterobacteriaceae; antimicrobial resistance.

INTRODUÇÃO

As β -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico, impossibilitando assim a sua atividade antimicrobiana. A produção de β -lactamases é o principal mecanismo de resistência das bactérias Gram-negativas. O grau de resistência ao β -lactâmico irá depender da quantidade de enzima produzida, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano em questão (potência) e da velocidade com que o β -lactâmico penetra pela membrana externa da bactéria (permeabilidade da membrana). A produção de β -lactamases também é responsável pela re-

sistência a alguns β -lactâmicos, como penicilina G e ampicilina, em bactérias Gram-positivas. Porém, a resistência aos β -lactâmicos mais estáveis em Gram-positivos é normalmente decorrente de alteração do sítio de ação, ou seja, das proteínas de ligação das penicilinas (PBPs).

As β -lactamases são produzidas por inúmeras espécies bacterianas, porém com diversidades estruturais e localizações diferentes. Em geral, nas bactérias Gram-positivas, as β -lactamases são secretadas para o meio extra-celular. Desta forma irão apresentar uma atividade menor que as β -lactamases produzidas pelas bactérias Gram-negativas. Nestas, as β -lactama-

Recebido em 20/7/2000

Aprovado em 22/8/2000

*Farmacêutico-Bioquímico-Microbiologista - Marcos Daniel Laboratório - Vitória/ES, Universidade Federal do Espírito Santo (UFES)

ses encontram-se estrategicamente situadas no espaço periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agir de modo mais eficaz sobre os β -lactâmicos que estão atravessando esse espaço para atingir as PBPs.

As *Extended Spectrum β -Lactamase* (ESBL ou β -lactamases de espectro estendido) são um grupo de enzimas de codificação plasmídica, derivadas das β -lactamases clássicas (TEM-1, TEM-2 e SHV-1). Diferentemente destas últimas, que conferem resistência às amino e ureidopenicilinas, as ESBL possuem seu espectro hidrolítico ampliado às cefalosporinas de terceira geração e aos monobactams.

Em 1983 foram detectadas na Alemanha os primeiros isolados clínicos de *K.pneumoniae* e *E.coli* resistentes às cefalosporinas de terceira geração, mas sensíveis à cefoxitina. A análise destas cepas demonstrou posteriormente que a resistência era devida à produção de uma β -lactamase plasmídica transferível, derivada de SHV-1, sendo denominada SHV-2. Desde então, tem sido descritas em todo o mundo numerosas enzimas dos tipos TEM e SHV com este fenótipo de resistência.

As ESBL hidrolisam as amino e ureidopenicilinas, cefalosporinas (exceto as cefamicinas) e os monobactams, não hidrolisando, entretanto, os carbapenems. A ação hidrolítica destas enzimas é bloqueada pelos inibidores de β -lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam).

Nos últimos anos tem sido descritas novas β -lactamases, também denominadas ESBL mas que não derivam de TEM ou SHV. Entre elas encontram-se as cefalosporinas derivadas da integração do gene cromossômico ampC em plasmídeos (conferindo resistência à todas as cefalosporinas, incluindo as cefamicinas). Estas enzimas foram descritas inicialmente em *K. pneumoniae* e *E. coli*. Outras novas β -lactamases, também de espectro ampliado, são as carbapenemases descritas recentemente em *E. cloacae* e *S. marcescens*.

Um dos principais problemas causados por estas enzimas é decorrente do fato de sua produção ser induzida durante a terapêutica antimicrobiana. Dessa maneira, quando a amostra bacteriana é detectada pelo laboratório de microbiologia ela é aparentemente sensível às cefalosporinas de terceira geração e penicilinas de amplo espectro. Porém, durante o tratamento ocorre indução da produção de grandes quantidades de enzimas e o paciente começa a evoluir mal com recidiva da infecção. Uma nova amostra da bactéria é isolada e esta poderá se mostrar resistente a um antimicrobiano (utilizado para o tratamento) para o qual a bactéria era inicialmente sensível, podendo até ser interpretado como erro laboratorial quando da avaliação da primeira amostra.

Epidemiologia das enterobactérias produtoras de ESBL

As enterobactérias produtoras de ESBL tem sido isoladas com maior frequência em amostras procedentes

de pacientes hospitalizados, porém também podem ser encontradas em amostras de origem comunitária. Estes isolamentos podem aparecer de forma esporádica, sem relação epidemiológica, ou dar lugar a surtos nosocomiais. A maioria destas epidemias afetam poucos pacientes em um período curto de tempo. Entretanto, cada vez é mais frequente a descrição de surtos nosocomiais mais extensos.

A codificação plasmídica deste tipo de resistência faz com que ela seja facilmente transferível por conjugação entre diferentes espécies bacterianas. Além disso, estes plasmídeos podem ter associados gens de resistência à outros tipos de antimicrobianos. Desta forma, podemos detectar surtos devido à disseminação de um plasmídeo (diferentes espécies de enterobactérias produtoras de ESBL com um plasmídeo comum) ou ainda a disseminação de uma cepa multirresistente (epidemiologia clonal).

O tubo digestivo atua como reservatório destes microorganismos multirresistentes. Além disso, é o habitat adequado para que a resistência seja transmitida à outras espécies bacterianas. Nos casos de epidemia, a colonização fecal pode chegar a 40% dos pacientes internados em unidades de risco (como as UTIs).

Dentre as enterobactérias produtoras de ESBL, *K. pneumoniae* é a espécie com maior frequência nos casos de surtos nosocomiais, seguida de *E. coli*. Também têm sido encontradas outras espécies como *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. e *Proteus* spp.

As primeiras epidemias de infecções hospitalares por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram descritas na França no final dos anos 80. Desde então, foram documentadas em todo o mundo numerosos casos de surtos nosocomiais causados por estas bactérias. Um estudo multicêntrico realizado em UTIs de 10 países europeus demonstrou que 22,8% dos isolados clínicos de *Klebsiella* spp. eram produtores de ESBL, sendo *K. pneumoniae* a espécie mais frequentemente isolada.

Entre os anos de 1988 e 1990 foram detectadas na Espanha os primeiros isolamentos de enterobactérias produtoras de ESBL. Foram descritos 59 isolados produtores de ESBL tipo SHV-2, sendo que 61% das cepas eram de *K. pneumoniae*, 31% de *S. marcescens*, 5% de *K. oxytoca* e 3% de *E. coli*. O surto nosocomial mais importante descrito até o momento naquele país foi ocorrido entre os anos de 1993 e 1995, no hospital de Bellvitge. Esta epidemia foi devida à disseminação clonal de uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de ESBL. Este surto atingiu 150 pacientes, dos quais 69,6% estavam internados na UTI. A cepa epidêmica era resistente às cefalosporinas de terceira geração, aztreonam, gentamicina, ciprofloxacina e produzia dois tipos de β -lactamases do tipo SHV transferíveis por conjugação.

O aparecimento de surtos nosocomiais devido a estes microorganismos depende tanto das condições ambientais (elevado consumo de cefalosporinas de terceira geração, manipulação dos pacientes, etc.) como das características especiais do microorganismo (fato-

res de virulência, aderência, etc.). Os fatores de risco para adquirir infecção/colonização são principalmente o consumo de antibióticos (especialmente cefalosporinas) e a cateterização arterial e/ou urinária.

Para o controle destes surtos nosocomiais tem sido aplicadas medidas como a restrição do consumo de cefalosporinas de terceira geração, isolamento cutâneo dos pacientes colonizados/infectados e educação do pessoal que lida diretamente com os pacientes quanto ao cuidado com a manipulação destes e a correta lavagem das mãos. A restrição do consumo de cefalosporinas de terceira geração relaciona-se em muitas ocasiões com o controle do surto, sendo a medida mais importante a ser adotada. A descontaminação intestinal seletiva como medida de controle de surtos, sugerida por alguns autores, pode ocasionar o desenvolvimento de novas resistências ou a seleção de outros microorganismos multirresistentes, sendo que a realização desta metodologia não é recomendada hoje em dia por órgãos como a OMS.

Alternativas terapêuticas em infecções por enterobactérias produtoras de ESBL

Somente alguns β -lactâmicos conservam sua atividade frente às enterobactérias produtoras de ESBL. As cefamicinas, como a cefoxitina, são frequentemente ativas e poderiam ser usadas. Porém estas drogas estimulam facilmente o desenvolvimento de resistência bacteriana por alterações na permeabilidade. O uso de combinações de penicilinas com inibidores de β -lactamases dependerá dos MICs que o microorganismo apresentar, uma vez que já foram descritos casos de resistência por hiperprodução de ESBL e por produção conjunta de ESBL e uma β -lactamase do tipo TEM-1; a combinação de uma cefalosporina de terceira geração com um inibidor de β -lactamase tem sido utilizada com êxito em alguns casos para o tratamento de sepsis causada por *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL. Entretanto, este tratamento é desaconselhado mesmo quando os MICs destes microorganismos se encontrem dentro do intervalo de sensibilidade, uma vez que já foram descritos vários fracassos terapêuticos. Por esta razão, o laboratório de microbiologia deve informar como "resistentes" as cefalosporinas de terceira geração e alertar para a presença de uma cepa multirresistente.

Os carbapenems são os antibióticos mais efetivos frente às enterobactérias produtoras de ESBL. Estas drogas são muito resistentes à hidrólise por este tipo de enzima. O uso de antibióticos carbapenêmicos deveria ser moderado, pois tem sido descrito um aumento da resistência à estas drogas em outras espécies bacterianas, como *Acinetobacter baumannii* e *P. aeruginosa* naqueles hospitais onde a droga tenha sido usada extensamente. A combinação da diminuição da permeabilidade junto com a hiperprodução de enzimas hidrolíticas tem gerado resistência em algumas espécies de enterobactérias. Estes dados alertam para a necessidade do uso racional dos antibióticos carbapenêmicos para prevenir a aparição de novos microorganismos multirresistentes.

Deteção das β -lactamases de Espectro Estendido

O trabalho do laboratório de microbiologia é imprescindível na detecção das enterobactérias produtoras de ESBL e de possíveis surtos nosocomiais. O microbiologista deve estar alerta quando se deparar com um fenótipo de resistência a β -lactâmicos pouco habitual e buscar a explicação para o mesmo. A detecção precoce destas cepas é importante para instaurar o tratamento adequado e as medidas de isolamento dos pacientes, necessárias para se evitar a disseminação.

Apesar da capacidade hidrolítica destas enzimas sobre as cefalosporinas de terceira geração e monobactams, os MICs dos microorganismos que as produzem poderiam ser classificados na categoria "sensível" segundo os critérios do NCCLS. Nestes casos, quando se trata de microorganismos tradicionalmente muito sensíveis às cefalosporinas de terceira geração como *E. coli* e *K. pneumoniae*, detecta-se uma elevação nos MICs destas drogas (MIC $\geq 2\mu\text{g/mL}$).

A ação hidrolítica destas enzimas faz com que, em algumas ocasiões, os MICs de ceftazidima sejam mais elevados que os da cefotaxima, por exemplo; outras vezes, pode ocorrer o contrário. Portanto é recomendável testar estes dois antibióticos na determinação da susceptibilidade antimicrobiana das enterobactérias. Quando se detecta a produção de ESBL deve-se informar como "resistente" a todas as cefalosporinas de terceira geração e monobactams, para que se tomem as medidas epidemiológicas adequadas e evitar que estas drogas sejam usadas no tratamento.

A dificuldade dos laboratórios de microbiologia em detectar esse tipo de resistência se deve a vários fatores. Em primeiro lugar, como se trata de resistência devido a inativação do antibiótico por degradação enzimática, o resultado do teste *in vitro* (antibiograma) vai depender da quantidade de bactérias utilizada no teste, isto é, quanto maior a quantidade de bactérias (ou inóculo) maior será a quantidade de enzimas (ESBL) e maior o grau de resistência detectado no teste. Como o teste *in vitro* é realizado com um inóculo padronizado, que pode ser bem menor que aquele encontrado no sítio infeccioso, a correlação clínica do teste é baixa. Isto é chamado de "efeito inóculo" e normalmente não acontece quando a resistência é decorrente de outros mecanismos. A importância clínica deste fato é que infecções purulentas que apresentam alta concentração bacteriana, como pneumonias e abscessos por exemplo, muito provavelmente não responderão ao tratamento com cefalosporinas, monobactams ou penicilinas de amplo espectro, mesmo que o teste *in vitro* mostre sensibilidade. Um outro ponto importante é o fato da velocidade com que essas enzimas degradam alguns β -lactâmicos ser muito baixa. Dessa maneira, o período de tempo utilizado pelo teste *in vitro*, isto é 18 a 24 horas, pode não ser suficiente para a expressão ou detecção deste tipo de resistência. Além disso, a velocidade e a potência com que cada tipo de ESBL degrada diferentes β -lactâmicos

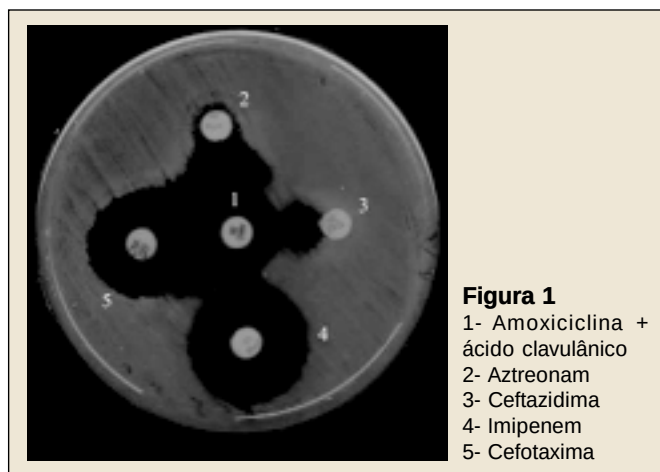


Figura 1
1- Amoxiciclina + ácido clavulânico
2- Aztreonam
3- Ceftazidima
4- Imipenem
5- Cefotaxima

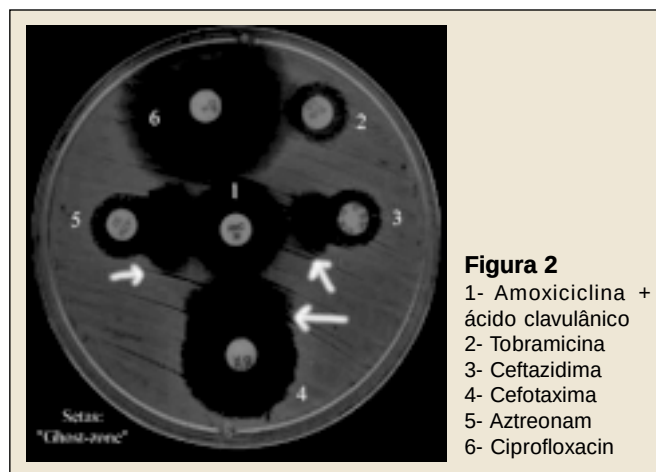


Figura 2
1- Amoxiciclina + ácido clavulânico
2- Tobramicina
3- Ceftazidima
4- Cefotaxima
5- Aztreonam
6- Ciprofloxacina

pode variar bastante. Dessa maneira, o teste pode detectar a resistência à ceftazidima, mas classificar a bactéria como sensível a ceftriaxona por exemplo.

Os testes utilizados para detecção da produção de ESBL se baseiam no aumento da sensibilidade (ou queda no MIC) para as cefalosporinas e monobactams, quando esses compostos são associados a inibidores de β -lactamases, sendo que o ácido clavulânico é o mais utilizado devido a sua maior atividade contra ESBLs. O NCCLS recomenda que amostras bacterianas (principalmente amostras de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *E. coli*) que apresentarem sensibilidade diminuída, isto é, MIC aumentado ($\geq 2\mu\text{g/mL}$) ou halo de inibição diminuído para ceftazidima (halo $\leq 22\text{ mm}$) ou aztreonam (halo $\leq 27\text{ mm}$) ou cefpodoxima (halo $\leq 22\text{ mm}$) ou ceftriaxona (halo $\leq 25\text{ mm}$) ou cefotaxima (halo $\leq 27\text{ mm}$) e apresentando MIC $\geq 2\mu\text{g/mL}$ (válido para todas as drogas citadas acima) sejam consideradas produtoras de ESBL.

• Técnica da dupla difusão com discos

A identificação de cepas produtoras de ESBL é feita mediante a sinergia de duplo disco. Realiza-se a difusão em ágar utilizando uma placa de ágar Mueller-Hinton inoculada com uma suspensão bacteriana ajustada com o padrão 0,5 da escala de MacFarland; após, colocam-se os discos com carga padronizada de cefotaxima, ceftazidima, cefuroxima e aztreonam, dispostos a uma distância de 20mm de discos de amoxiciclina + ácido clavulânico. É considerada sinergia positiva (e, portanto, detecta-se a produção de ESBL), quando observa-se uma ampliação do halo de inibição em alguma das cefalosporinas ou do aztreonam ou o aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição entre o disco de amoxiciclina + ácido clavulânico e o disco de uma das drogas β -lactâmicas (denominada "Ghost-Zone"). Esta técnica é de fácil realização e acessível à qualquer laboratório de Microbiologia. (Figuras 1 e 2)

• Técnica do E-Test®

O E-Test® é uma tira de papel impregnada com antibióticos. Uma tira especial foi desenvolvida para a detecção da produção de ESBL. A metade da tira contém uma concentração decrescente de ceftazidima (de

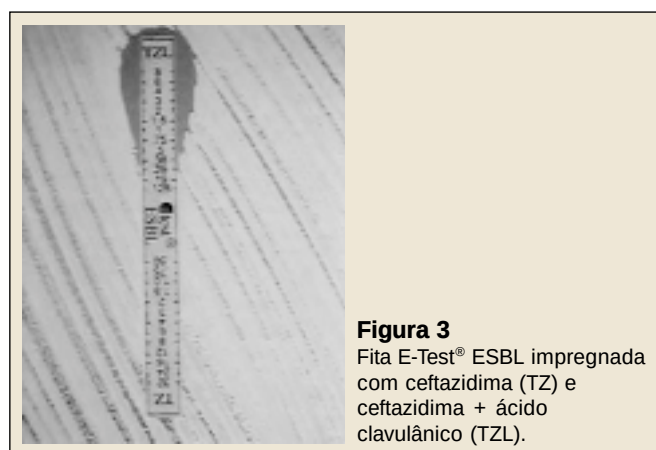


Figura 3
Fita E-Test® ESBL impregnada com ceftazidima (TZ) e ceftazidima + ácido clavulânico (TZL).

32 $\mu\text{g/mL}$ até 0,5 $\mu\text{g/mL}$). Na outra metade da tira, há uma concentração de ceftazidima + ácido clavulânico (2:1), em concentrações decrescentes de 8 $\mu\text{g/mL}$ até 0,12 $\mu\text{g/mL}$. Considera-se positiva a sinergia com o ácido clavulânico caso haja uma diminuição de duas ou mais diluições do MIC da ceftazidima quando adicionada ao inibidor de β -lactamase. Esta técnica é razoavelmente acessível e de fácil realização; entretanto, pode gerar resultados confusos se usada isoladamente, pois estaremos testando somente uma droga. (Figura 3)

• Técnica da sinergia com inibidores de β -lactamases

Pode-se testar também a presença de ESBL mediante a realização do teste de MIC por macro ou microdiluição de cefalosporinas de terceira geração com e sem inibidor de β -lactamase. A realização da prova usando-se somente uma droga (por exemplo a ceftazidima), pode ocasionar os mesmos problemas descritos na técnica anterior.

• Microbiologia automatizada

Alguns painéis de microdiluição estão disponíveis, comercializados principalmente para os sistemas MicroScan® (Dade Behring) e Vitek® (bioMérieux).

Problemas na realização destas técnicas

Estas técnicas possuem algumas limitações, pois a

hiperprodução de algumas β -lactamases por certos microorganismos pode ocasionar uma sinergia positiva com o ácido clavulânico, a saber:

1) a hiperprodução de β -lactamase cromossômica por *Proteus vulgaris*, *P. penneri* ou *Citrobacter koseri* (que é uma cefuroxime inibida pelo ácido clavulânico), pode resultar em uma ampliação do halo com a cefuroxima, cefotaxima e ceftriaxona. A hiperprodução desta enzima confere resistência à estas drogas, permanecendo sensível à ceftazidima e ao aztreonam;

2) a hiperprodução de β -lactamase K1 por *Klebsiella oxytoca* produz ampliação do halo com a cefuroxima, ceftriaxona, aztreonam e cefotaxima, mas nunca com a ceftazidima. A hiperprodução de β -lactamase confere resistência à estas drogas mas não à ceftazidima. Portanto, para diferenciar uma cepa de *K. oxytoca* hiperprodutora de K1 de uma produtora de ESBL deve-se realizar sempre o método de determinação do MIC da ceftazidima e verificar se este valor se reduz na presença de ácido clavulânico;

3) a hiperprodução de SHV-1 por *K. pneumoniae*, causada pela presença de múltiplas cópias do plasmídeo que as codifica, também pode ocasionar um fenótipo compatível com a produção de ESBL. Nestes casos, há um aumento dos MICs da ceftazidima (4-8 μ g/mL) e do aztreonam (1-2 μ g/mL), afetando escassamente os MICs da cefotaxima e ceftriaxona;

4) a produção de L2 por *Stenotrophomonas maltophilia* resulta em sinergia positiva com aztreonam devido à ação hidrolítica desta enzima sobre o aztreonam, sendo inibida pelo ácido clavulânico. Portanto, não devemos confundir este tipo de resistência com a provável produção de ESBL.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O trabalho do laboratório de microbiologia é imprescindível na detecção das enterobactérias produtoras de ESBL e de possíveis surtos nosocomiais. Portanto, o microbiologista deve se manter sempre atualizado e preparado para realizar testes com acurácia cada vez maior e que estes reflitam com fidelidade os resultados encontrados. A detecção precoce destas bactérias multirresistentes é de suma importância para se instaurar o tratamento adequado e as medidas de isolamento dos pacientes, necessárias para se evitar a disseminação destes patógenos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 1211-1233, 1995.
2. Dubois, S.K.; Marriott, M.S.; Amyes, S.G.B. TEM and SHV-derived extended spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother.* 35: 7-32, 1995.
3. Emery, C.L.; Weymouth, L.A. Detection and clinical significance of extended-spectrum β -lactamases in a Tertiary-Care Medical Center. *J. Clin. Microbiol.* 35: 2061-2067, 1997.
4. Jacoby, G.A.; Han, P. Detection of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 34: 908-911, 1996.
5. Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. More extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 35: 1697-1704, 1991.
6. Katsanis, G.P.; Spargo, J.; Sutton, L. Detection of *Klebsiella pneumoniae*

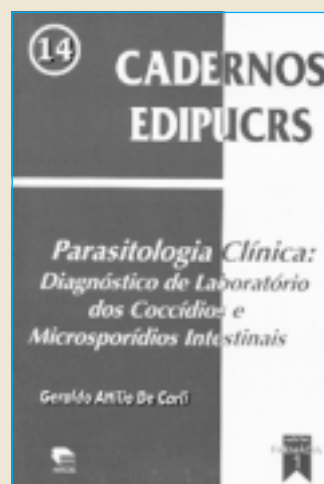
and *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases. *J. Clin. Microbiol.* 32:691-696, 1994.

7. Livermore, D.M. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8:557-584, 1995.
8. Murray, P.R. et al. *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1995.
9. NCCLS: M7-A5: Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - 50th Edition (Includes Supplemental Tables M100-S10), 2000.
10. Sanford, J.P. et al. *Guide to Antimicrobial Therapy*, 26th ed., 1996.
11. Sanders, C.C.; Sanders W.E. β -Lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin. Infect. Dis.* 15: 824-883, 1992.
12. Shah, P.M.; Stille, W. *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains more susceptible to cefoxitin than to third generation cephalosporins. *J. Antimicrob. Chemother.* 11:597-601, 1983.
13. Sirot, D. Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. *J. Antimicrob. Chemother.* 36 (Suppl A):19-34, 1995.
14. Silva, C.H.P.M. *Bacteriologia, Um Texto Ilustrado*. 1^a ed. Rio de Janeiro: Editora Eventos, 1999.
15. Silva, J.; Zacarias, C. β -Lactamase bioassay: a simplified method to determine extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in Enterobacteria. *Arch. Med. Res.* 28(2): 285-287, 1997.
16. Silva, J. Mechanisms of antibiotic resistance. *Curr. Ther. Res.* 57(supl A): 30-35, 1996.
17. Silva, J. et al. Extended-spectrum β -lactamases coded in clinical isolates of enterobacteria in Mexico. *Microb. Drug Resist.* 5:189-193, 1999.
18. Smith, C.E. et al. Failure of ceftazidime-amikacin therapy for bacteremia and meningitis due to *Klebsiella pneumoniae* producing an extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:1290-1293, 1990.

Endereço para correspondência

Carlos Henrique P. de M. e Silva
Rua Fortunato Ramos, 123 - Sta. Lúcia
Vitória/ES - 29055-290
chpmstz@terra.com.br

LANÇAMENTO



Brochura
73 páginas
15 x 22 cm

Esse Manual foi escrito para os profissionais da área das Análises Clínicas e principalmente para os estudantes que buscam conhecer os elementos básicos do diagnóstico microscópico e que necessitam adquirir experiência nos procedimentos de laboratório voltados à pesquisa e as suas aplicações na Parasitologia.

EDIPUCRS

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 33
Caixa Postal 1429 - Porto Alegre - RS - 90619-900 - Brasil
Fone/fax: (51) 320-3523 Ramal 3523
<http://ultra.pucrs.br/edipucrs> • E-mail: edipucrs@pucrs.br

Perfil eletroforético das proteínas e concentração das imunoglobulinas plasmáticas em pacientes assintomáticos e sintomáticos portadores de HIV

Proteins' electrophoretic profile and immunoglobulins plasmatics concentration in asymptomatics and symptomatic patients infected by HIV

Queiroz, M.G.R*.; Oliveira, E.M.; Santos, M.S.; Holanda, B.A.P.; Alencar, N.M.N & Melo, C.L.

RESUMO - Estudos têm demonstrado que 81% dos pacientes infectados pelo HIV apresentam um padrão proteico anormal devido ao estado hipermetabólico. Os achados laboratoriais revelam que as anormalidades da imunidade humoral precedem a imunidade mediada pelas células e portanto, o diagnóstico da infecção pelo HIV depende do estabelecimento da infecção definindo o estado imunológico e o quadro clínico do paciente que ocorre secundário à infecção e à perda da função imune. No presente trabalho, realizamos um estudo comparativo do perfil eletroforético das proteínas, bem como a determinação da concentração das imunoglobulinas plasmáticas em pacientes portadores de HIV (assintomáticos e sintomáticos) com o objetivo de investigarmos alterações específicas das frações protéicas (albumina e globulinas) durante os diferentes estágios da doença. Foram analisadas 30 amostras de sangue coletado de pacientes HIV positivos divididos em dois grupos (assintomáticos e sintomáticos). As proteínas totais foram determinadas pelo método do Biureto, sendo observada uma hipoproteïnemia em 60% dos pacientes sintomáticos e valores normais em todos os assintomáticos. A eletroforese das proteínas foi realizada em gel de agarose mostrando hipoalbuminemia em 70% dos pacientes assintomáticos e 90% sintomáticos. A hipergamaglobulinemia predominou em 100% dos sintomáticos e 90% dos assintomáticos. As frações α e β globulinas apresentaram-se normais nos dois grupos. As imunoglobulinas foram avaliadas por turbidimetria e uma elevação significativa foi verificada na concentração de IgG em todos os pacientes sintomáticos. Por outro lado, os valores de IgA e IgM apresentaram-se dentro dos valores de referência. Os resultados estão de acordo com vários trabalhos citados na literatura, comprovando que a AIDS é uma gamopatia monoclonal, caracterizada por hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. O trabalho mostra portanto, que, a avaliação de parâmetros laboratoriais mais simples são úteis no monitoramento da síndrome em estudo, como também fortes indicadores do estágio da doença.

PALAVRAS-CHAVE - Proteínas; imunoglobulinas; AIDS.

ABSTRACT - Studies have been demonstrated that 81% of the patients infected by HIV present an abnormal proteic standard, due to hypermetabolic state. The laboratory discoveries reveals that the abnormalities in the immunity humoral precede the immunity mediated by the cells, since the HIV diagnosis depends on the establishment of the infection that defines both the immunological and the clinical state of the patient. In the present work we accomplished a comparative study of the proteins electrophoretic profile, and the plasmatic immunoglobulin concentration of the plasmatic patient with HIV (no symptomatic and symptomatic). The objective of was to investigate the alterations in specific proteins and immunoglobulins during the different stages of the disease. It was appraised 30 serum samples of HIV positive, divided in two groups (no symptomatic and symptomatic). The total proteins were measured by Biuret, being observed a hypoproteinemia in 60% of the symptomatic and normal value in all the no symptomatic. The agarose gel electrophoresis showed hypoalbuminaemia in 70% of the serum from no symptomatics and 90% from symptomatic patients. The hypergammaglobulinaemia prevailed in 100% of the symptomatic and 90% of the asymptomatic patients. The α and β globulins fractions came normal in the two groups. The imunoglobulin was appraised by quantitative immunoturbidimetric method and a significant elevation was verified in the IgG concentration in all the symptomatic patients. On the other hand, the values of IgA and IgM take reference values inside. The results are in agreement with several the literature works mentioned in checking that the AIDS is a monoclonal gamopatie characterized by hypoalbuminaemia and hypergammaglobulinaemia. The work exhibition therefore that the evaluation of simple laboratory parameters can be useful for monitoring AIDS as well as they are strong indicators of the stage of the disease.

KEY WORDS - Proteins; immunoglobulins; AIDS.

Recebido em 03/7/2000

Aprovado em 22/8/2000

*Professora do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas/Universidade Federal do Ceará - UFC
Rua Deputado João Pontes, 851/402, Bairro de Fátima, Fortaleza, CE, 60040-430

INTRODUÇÃO

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), é uma infecção causada por vários tipos de retrovírus incorporados ao DNA de células hospedeiras que resulta em uma série de alterações clínicas, variando de estados assintomáticos a desordens severamente debilitantes e fatais. A infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) é associada à inativação dos linfócitos T Helper específicos (T4) e glicoproteínas transmembranares CD4.^{1,2}

O resultado da imunossupressão torna o paciente susceptível a uma variedade de infecções oportunistas identificada como um conjunto de alterações provocadas pela perda da imunidade celular. As infecções causadas pelos microrganismos conduzem o hospedeiro a várias respostas, as quais incluem desordens no metabolismo intermediário.⁴

O diagnóstico e o monitoramento da infecção pelo HIV podem ser realizados através da cultura do vírus, detecção dos anticorpos e/ou proteínas do HIV (gp160, gp41, gp120 e p24) bem como a realização de provas de avaliação do estado imunológico do paciente. Sabemos ainda, que, a contagem de CD4 é um dos exames realizados para prever a vulnerabilidade do portador desta síndrome a infecções oportunistas.⁵

O padrão de perda de linfócitos CD4+ procede em três fases e as taxas variam de paciente para paciente. Em alguns meses a infecção provoca uma redução dos valores relativo e absoluto de CD4+ circulante, da ordem de 40 a 50%. Então, um período prolongado de um declínio lento é seguido por outro de declínio rápido em um intervalo de tempo antes do desenvolvimento da AIDS.⁶

A produção de citocinas e os altos níveis de complexos imunes circulantes associados à infecção pelo HIV também poderão induzir alterações através de mecanismos imunológicos.⁷ Portanto, a imunidade humoral também apresenta-se deficiente, instalando-se um quadro de hiperplasia dos linfócitos B que causa linfadenopatia e aumenta a secreção de anticorpos conduzindo a uma hipergamaglobulinemia. Nos pacientes portadores de HIV, os níveis de anticorpos (especialmente IgG e IgA) podem aumentar, mas os títulos de anticorpos para agentes específicos (ex: citomegalovírus) não se elevam.⁶

A importância dos parâmetros laboratoriais no acompanhamento, prognóstico e tratamento da AIDS, consiste nas variações qualitativas e quantitativas que estes podem apresentar nos diferentes estágios da doença.

Pesquisadores têm sugerido que o paciente soropositivo é hipermetabólico e que esta resposta se deve ao aumento do turnover das proteínas de fase aguda.⁷

A análise do quadro protéico plasmático é de particular interesse bioquímico em virtude de importantes progressos acumulados sobre o significado clínico da patologia em discussão.

Com base nos achados acima, foi realizado um estudo comparativo do perfil eletroforético das proteínas, bem como a avaliação das imunoglobulinas séricas em

pacientes sintomáticos e assintomáticos portadores de HIV com a finalidade de analisar as alterações nas frações proteicas específicas e avaliar a concentração das imunoglobulinas durante o curso da doença.

MATERIAL E MÉTODOS

• Amostra biológica

O presente estudo foi realizado com o soro sanguíneo de um grupo de 30 pacientes (sexo e faixa etária variáveis), HIV positivos, divididos em dois grupos de acordo com o estágio da doença (sintomáticos e assintomáticos).

• Determinação das proteínas totais

As proteínas totais foram determinadas pelo método do Biureto (Labtest).

• Eletroforese das proteínas

A corrida eletroforética das frações protéicas (albumina, α_1 , α_2 , β e γ globulinas) foi feita em Tampão Veronal Sódico (pH 8,6) usando como suporte o gel de agarose. Após a coloração com amido black, as frações foram quantificadas por densitometria (DS-35 Celm) e expressas em g/dL e percentual protéico de cada grupo (sintomáticos e assintomáticos). Os resultados foram comparados com os do grupo de pacientes saudáveis (controle).

• Dosagem das imunoglobulinas

As imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) foram quantificadas por turbidimetria através de automação Turbitimer - Behring. Os resultados foram expressos em mg/dL sendo comparados com os do grupo controle.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos e apresentados nas Figuras 1 e 2 demonstram os valores da concentração das proteínas séricas na qual podemos observar um quadro laboratorial relacionado aos diferentes estágios da doença. Isto se deve a alterações no metabolismo intermediário no que diz respeito ao estado hipermetabólico do paciente infectado pelo HIV.

Os pacientes assintomáticos e sintomáticos apresentaram hipoalbuminemia quando comparada ao controle, que se deve tanto à elevação do catabolismo protéico como à desnutrição associada à síndrome de má absorção.⁸

O efeito da má absorção no estado nutricional não depende somente da severidade e da duração da síndrome, mas também da ingestão energética.⁹ Pacientes com má absorção crônica desenvolvem hiperfagia que tende a compensar a sua incapacidade absorptiva. Muitos deles são hábeis em manter um estado nutricional aceitável, apesar da acentuada má absorção. Outro fator que provoca hipoalbuminemia é a infecção hepática contraída por pacientes imunodeprimidos causando danos à síntese de albumina.

Os pacientes com AIDS podem desenvolver uma variedade de anormalidades renais que são classificadas como desordens coincidentes e específicas asso-

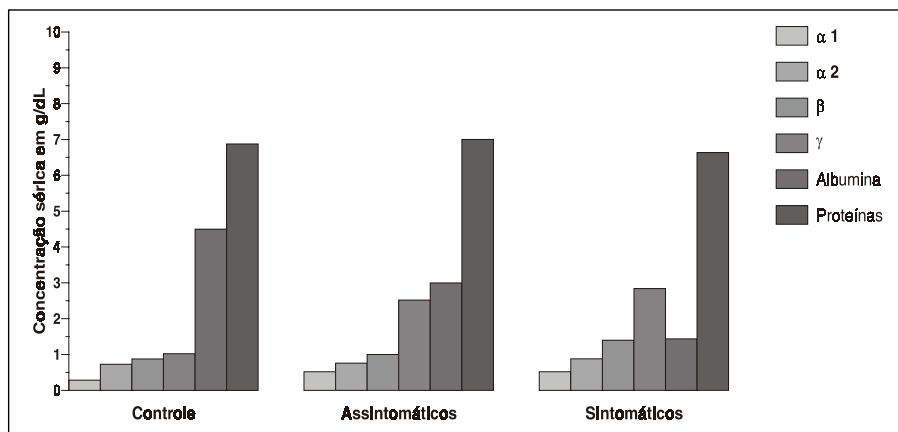


Figura 1 - Proteínas totais e frações no soro de pacientes saudáveis e HIV positivo (assintomáticos e sintomáticos). As barras representam as médias $\pm$ E.P.M. dos níveis séricos (g/dL) das proteínas totais, albumina e imunoglobulinas (α_1 , α_2 , β e γ) dos pacientes do grupo controle e HIV positivos (assintomáticos e sintomáticos). Em todos os grupos foram analisadas 30 amostras. $p < 0,05$ representa as diferenças estatísticas comparadas ao grupo controle (ANOVA; Teste de Duncan)

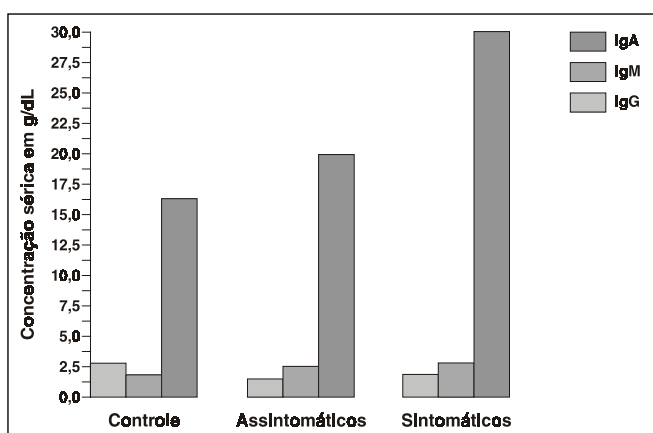


Figura 2 - Níveis séricos das imunoglobulinas de pacientes do grupo controle e portadores de HIV (assintomáticos e sintomáticos). As barras representam as médias $\pm$ E.P.M. dos níveis séricos (mg/dL) de IgA, IgM e IgG. Em todos os grupos foram avaliados 30 amostras. $p < 0,05$ representa as diferenças estatísticas comparadas ao grupo controle (ANOVA; Teste de Duncan).

TABELA 2
Valores de Referência

Imunoglobulinas	mg/dL
IgA	85 - 490
IgM	60 - 320
IgG	800 - 1.700

ciadas à infecção pelo HIV. A nefropatia que surge nestes pacientes é caracterizada por proteinúria ($> 2\text{g}/24\text{h}$) resultando em um quadro de síndrome nefrótica e consequentemente insuficiência renal.

A produção desordenada de citocinas e os altos níveis de complexos imunes circulantes podem causar alterações glomerulares súbitas que levam ao aparecimento da microalbuminúria. Este mecanismo ainda não está esclarecido mas, sabe-se que ocorre através de mecanismos imunológicos.¹⁰

O presente estudo investigou a relativa contribuição dos exames aqui relatados nos estágios desta síndrome e os resultados apresentados na Figura 2 mostram hipergamaglobulinemia mais acentuada nos pacientes sintomáticos. As globulinas α_1 , α_2 e β permaneceram inalteradas

em ambos os grupos enquanto que as imunoglobulinas IgM e IgA apresentaram-se dentro dos valores de referência. Os níveis de IgG estão bastante elevados nos dois grupos, o que caracteriza o estado crônico da doença.

Não estamos diante de nenhum dado inédito, mas, podemos assegurar que o quadro clínico dos pacientes em estudo é caracterizado por uma gamopatia monoclonal e que a avaliação destes parâmetros bioquímicos são importantes para detectar alterações durante os estágios da doença, não esquecendo o fato de que os pacientes poderão realizá-los com mais frequência e o profissional de saúde terá um maior controle sobre o mesmo.

A importância do presente trabalho não se deve somente aos dados obtidos, mas também ao fato de termos incluído no início desta pesquisa um paciente considerado soro-positivo e assintomático, cujo perfil das análises laboratoriais verificadas na pesquisa era idêntico ao do controle. Diante deste achado, orientamos o paciente no sentido de confirmar o teste sorológico anterior, cujo resultado tornou este trabalho o mais importante e gratificante da nossa carreira acadêmica. Foi comprovado com segurança que o referido paciente era na verdade soro-negativo e tudo não passou de um erro laboratorial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Gottlieb, M.S., Groopman J.E., Weinstein, W.M., Fahey, J.L., Detels, R.L., 1983, *Ann. Inter. Med.* 99, 208-220.
- Bowen, D.L., Lane, H.C., Fauci, A. S. (1985) *Ann. Inter. Med.* 103, 704-709
- Beisel, W.R., (1975) *Anu. Ver. Med.* 26, 9-20.
- Kabanda, A.; Vandercam, B.; Bernard, Laureys, R., Strilhou, Y.C. (1996) *American Journal of Kidney Disease*, 27, 803-808.
- Carbonnel, F., Beaugerie, Rached, A. A. Almagne, Rozenbaum, W, Quintec, Y, Grende, J.P., Cosnes, J., (1997) *Gut*, 41, 805-810.
- Engel, W.R., Real, F.M.J., Huix, G.F., Milagros, P., Mascaró, J. Bragado, G.F., (1996) *Clinical Endocrinology*, 44, 553-58.
- Cardinali, A., Griember, G., Gasparini S., Breconi, P.R., Reboredo, G., (1990) *Acta Bioquímica Clínica Latino América*, 4, 313-321.
- Jornard, P.P., Rambaud, J.C., Dive, C.M., Vaeman, J.P., Galian, A., Delacroix D.L. (1984) *Clin. Invest.* 74, 525-535.
- Cosne, J., Beaugerie, L., Quintec, L.M., Grende, J.P., Quintec, Y., (1990) *Gastroenterology*, 99, 1814-1819.
- Maurty, C.P.J., Ladhervita, J., (1990) *J. Intern. Med.* 227, 253-257.

Endereço para correspondência
Profª Drª Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas - DACT
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem - FFOE
Universidade Federal do Ceará - UFC
Fax: (0xx85)288-8282 • e-mail: magorq@ufc.br

Tireotropina em sangue seco em papel filtro: uma nova alternativa de uso do kit ACS:180TM em luminômetros manuais ou semi-automáticos

Thyrotropin in dried blood filter paper: the alternative use for TSH-ACS:180TM kit in manual or semi-automatic luminometers

Eurico Camargo Neto*

RESUMO - A quantificação da tireotropina é empregada em programas de triagem neonatal para o diagnóstico precoce do hipotireoidismo congênito e do seu tratamento preventivo, evitando as irreversíveis seqüelas neurológicas decorrentes da doença. Além dos kits comerciais disponíveis no mercado, outras alternativas 'domésticas', de menor custo, já foram previamente descritas. Neste trabalho é apresentada uma adaptação para a quantificação de tireotropina em sangue seco em papel filtro a partir de um kit desenvolvido para a quantificação sérica da tireotropina por quimioluminescência em equipamento de automação, com resultados superiores aos obtidos pelo método empregado na nossa rotina.

PALAVRAS-CHAVE - Triagem neonatal; TSH; quimioluminescência.

SUMMARY - The measurement of thyrotropin is used in neonatal screening programs for the early diagnosis of the congenital hypothyroidism and its preventive treatment, avoiding the irreversible sequelae due to the disease. Despite the commercial kits available in the market, other in-house procedures less expensive were already described. In this paper an adaptation for the measurement of thyrotropin in filter paper blood spots is described, using an automated chemiluminescent thyrotropin kit developed for a fully automatic equipment, with better results than the obtained by our routine method.

KEY WORDS - Neonatal screening; TSH; chemiluminescence.

INTRODUÇÃO

A quantificação dos níveis de tireotropina (TSH) em sangue seco em papel filtro, obtido por punção de calcâneo em neonatos, tem-se constituído em uma ferramenta eficaz e universalmente aceita a partir da proposta de triagem neonatal do hipotireoidismo congênito por Dussault e Laberge há quase três décadas¹, como forma de diagnóstico precoce da doença e prevenção das seqüelas decorrentes da falta do hormônio tireóideo². Nos últimos anos publicamos alternativas economicamente viáveis de utilizar o método de quimioluminescência (kits Magic Lite^{MR} e ACS:180^{MR}, produzidos para análise de TSH em soro por Chiron Diagnostics, Walpole, MA, USA), para a análise quantitativa de TSH em amostras de sangue seco em papel filtro^{3,4,5} recebidas pelo Centro de Triagem Neonatal de Porto Alegre, como alternativa aos kits comerciais especialmente fabricados para esta finalidade e com custo inferior a US\$ 0,5. Desde a adoção do método de quimioluminescência como rotina em nosso laboratório há

9 anos, 670.000 amostras foram testadas, identificando-se 224 pacientes com hipotireoidismo (1/3.000), 43 dos quais com tiroxina (T₄) normal na mesma amostra. Este dado confirma a importância da escolha da TSH como teste primário na triagem populacional para o hipotireoidismo congênito, uma vez que a análise apenas da T₄ nestas amostras implicaria em resultados falso-negativos, resultando em crianças com atraso do crescimento e do desenvolvimento ósseo e severo risco de deficiência mental². Neste período, o percentual de análises repetidas na mesma amostra foi de 0,32% (resultados inicialmente alterados e com valores normais em uma segunda análise realizada em duplicata na mesma amostra) e os casos falso-positivos observados foram de 0,02%. Nenhum resultado falso-negativo foi reportado até o momento.

MATERIAL E MÉTODOS

A técnica utilizada para uso em sangue seco em papel filtro no procedimento manual com o kit TSH-

Recebido em 19/05/2000

Aprovado em 03/7/2000

*Bióquímico do Laboratório Nobel RIE, DNA4-Laboratório de Genética e Biologia Molecular e do Centro de Triagem Neonatal
Av. Ipiranga, 5.000 - 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

ACS:180 está descrita no Quadro I. Um ponto da curva equivalente a zero de TSH deve ser preparado utilizando-se sangue humano heparinizado, centrifugado e lavado 2 vezes com solução salina isotônica. As hemácias devem ser ressuspensas em soro humano de pacientes com hipertireoidismo e com TSH suprimido, de forma a obter-se um hematócrito de 55%. Posteriormente, 100µL desta suspensão deve ser aplicada sobre papel SS 903™ e secar à temperatura ambiente por, pelo menos, 4 horas.

Padrões da curva do kit DELFIA™ (Wallac Oy) podem ser utilizados convertendo-se os valores expressos no rótulo em µUI/mL de sangue total para µUI/mL soro equivalente, multiplicando-se cada ponto da curva por 2,2.

• Princípio do teste

O teste baseia-se em reação direta tipo "sanduíche", utilizando quantidades constantes de dois anticorpos: o primeiro, monoclonal e produzido em rato, ligado ao éster de acridina; e, o segundo, policlonal e produzido em carneiro, covalentemente ligado a partículas paramagnéticas como fase sólida. A concentração de TSH é diretamente proporcional à quantidade de luz emitida na reação.

RESULTADOS

A utilização dos volumes de reagentes propostos

QUADRO I

Protocolo de quantificação de TSH em sangue seco em papel filtro com o reagente TSH-ACS:180

Eluição da amostra e procedimento

1. Em placas de microtitulação colocar um: Confete de 3 mm de padrões, controles e amostras + 150µL de eluente, agitar 30 minutos à temperatura ambiente, e transferir 100µL do eluato para tubos Sarstedt 12x75 e adicionar 250µL do anticorpo marcado diluído 1/40.
2. Incubar *overnight* à temperatura ambiente ou *overweekend* entre 4-8 °C e adicionar 200 µL do anticorpo anti-TSH acoplado a partículas paramagnéticas, deixar em repouso 30 minutos e proceder a separação magnética por 3 minutos.
3. Decantar e lavar 2 vezes com 500 µL de água destilada e ressuspender as partículas em 100 µL de água destilada e ler no luminômetro durante 2 segundos.

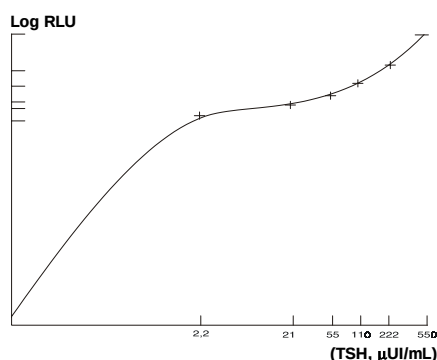


Figura 1 - Curva padrão obtida com volume de reagentes propostos pelo fabricante.

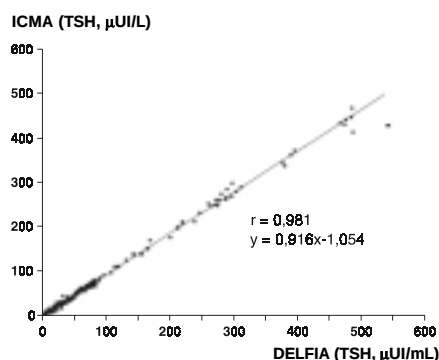


Figura 2 - Correlação entre os testes com reagente ACS:180 e o reagente TSH Magic Lite em 546 amostras e controles.

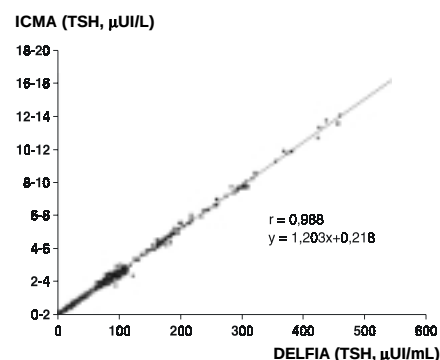


Figura 3 - Correlação entre 546 amostras normais testadas pelos métodos ACS:180 manual e o método DELFIA.

na técnica empregada no soro não foram capazes de produzir uma curva padrão aceitável e com uma ampla distinção entre os padrões e controles utilizados (Fig. 1), evidenciando a necessidade de titulação do anticorpo marcado.

A correlação entre o teste com o reagente ACS:180 e o método luminométrico com reagentes TSH Magic Lite em 546 amostras da nossa rotina podem ser observados na Figura 2, apresentando coeficiente de correlação linear de 0,981 e $y = 0,916x - 1,054$. A comparação com as mesmas amostras testadas pelo método ACS:180 manual e o método DELFIA (Wallac) é apresentado na Figura 3, com coeficiente de correlação linear de 0,988 e $y = 1,203x + 0,218$. A distribuição de 6.452 amostras normais analisadas pelo método aqui proposto é observada na Figura 4.

• Precisão intra-ensaio e interensaio

Quinze replicatas de controles do CDC números 911603, 9112422 e 913208, de valores respectivamente iguais a 20,0µUI/mL, 40,0µUI/mL e 80,0µUI/mL foram testados em uma única análise (variação intra-ensaio) e em 3 dias alternados (variação inter-ensaio).

Valores obtidos:

	CV intra-ensaio	CV interensaio
20,0µUI/mL	8,9%	10,0%
40,0µUI/mL	7,1%	9,5%
80,0µUI/mL	5,5%	6,7%

• Ensaios de sensibilidade

Quinze replicatas do padrão DELFIA 2,2 µUI/L soro equivalente foram analisadas e a sensibilidade analítica do ensaio calculada como ± 2 desvios padrões da média, permitindo estabelecer uma sensibilidade de 2,0 µUI/mL.

• Ensaios de linearidade

Utilizando-se eluatos de dois e três confetes do padrão de TSH de 550,0µUI/mL soro equivalente, observou-se que o método é linear até 1.500,0µUI/mL (Figura 5).

DISCUSSÃO

O teste manual de rotina utilizando o produto Ma-

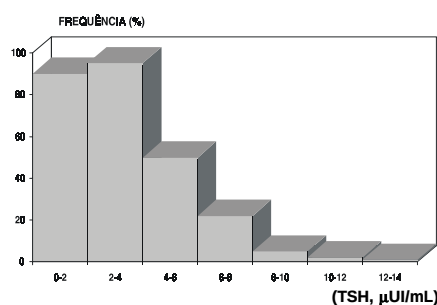


Figura 4 - Distribuição da [TSH] em 6.542 amostras normais.

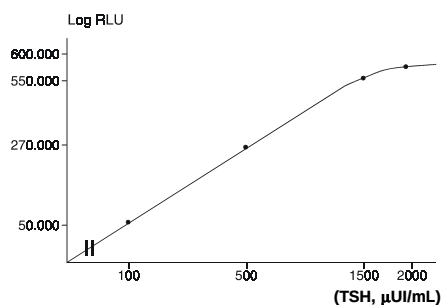


Figura 5 - Teste de linearidade do método ACS:180 manual.

descrito acima permite-nos a quantificação da TSH em eluatos de sangue seco em papel filtro específico ("cartões de Guthrie"), utilizando quantidades equivalentes a 1,0μL de soro obtidas a partir de um confete de 3 mm de diâmetro. Conforme pode-se observar na Figura 5, a grande diferença em RLUs entre o primeiro e o último ponto da curva, permitindo uma excelente discriminação na con-

centração de TSH que está sendo quantificada com uma sensibilidade estimada em 2,0μUI/mL, associada à possibilidade de diluir eluatos com valores de TSH superiores ao último ponto da curva, permitindo-nos afirmar que o mesmo é válido para a triagem do hipotireoidismo congênito, mesmo em programas com grande volume de amostras.

gic Lite foi testado em paralelo com o kit DELFIA utilizando-se amostras da rotina e controle de sangue seco em papel filtro fornecidos pelo *Centers for Disease Control and Prevention-CDC* (Atlanta, GA, USA), obtendo-se um coeficiente de correlação de 0,958. Os resultados comparativos entre os dois métodos foram previamente publicados e extensivamente analisados.^{5,7}

A diferença básica entre os dois métodos, TSH em soro ou em papel filtro, consiste no tempo de incubação de cada teste e nas variáveis de volumes empregados de cada reagente em cada ensaio. Desta forma, o kit Magic Lite desenhado para quantificar a TSH em 200μL de soro em 2,5 horas de ensaio foi adaptado para quantificar TSH em papel filtro em uma incubação *overnight*³. Para o kit ACS:180, proposto para quantificar a TSH sérica em 15 minutos a partir de 200μL de amostra e à 37 °C, levaram-se em consideração duas variáveis para sua utilização em uma incubação *overnight*: a utilização de confetes de sangue total de 3 mm contendo aproximadamente 1,5μL de soro na obtenção do eluato e de cerca de 1μL de soro para realização da prova^{8,9}, mais a necessidade de titulação e diluição do reagente luminescente (éster de acridina) na proporção de 1/40. Esta diluição é justificada pelo gráfico obtido na Figura 1, e a razão de tal fato está na relação de volumes de amostra e do anticorpo marcado com o éster de acridina, obrigando-se a uma diluição deste último até obter-se uma concentração de equilíbrio, obedecendo-se à lei de ação e massa que rege os imun ensaios não-competitivos¹⁰. O segundo anticorpo pode estar em excesso na solução uma vez que a sensibilidade e a linearidade do teste são determinadas pela primeira etapa da reação.

Em 77.954 amostras analisadas, adicionais às descritas em "Introdução", foram detectados 26 novos casos de hipotireoidismo, utilizando-se um *cut off* de 20,0μUI/mL soro equivalente (10,0μUI/mL de sangue total), como proposto por Naruse e colaboradores¹¹, com a finalidade de evitar resultados falso-negativos. O número de pacientes detectados com hipotireoidismo congênito com o novo procedimento mostrou a mesma proporção de 1/3.000 casos descritos⁶ desde o início do nosso programa.

O crescente interesse em métodos preventivos em saúde pública, em particular o hipotireoidismo congênito, pelo seu simples e eficaz tratamento, além do baixo custo, sustenta as tentativas de se criar métodos mais baratos e seguros para a sua utilização em larga escala. A excelente atividade funcional do procedimento

centração de TSH que está sendo quantificada com uma sensibilidade estimada em 2,0μUI/mL, associada à possibilidade de diluir eluatos com valores de TSH superiores ao último ponto da curva, permitindo-nos afirmar que o mesmo é válido para a triagem do hipotireoidismo congênito, mesmo em programas com grande volume de amostras.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece ao auxiliar técnico André Costa pela valiosa colaboração e à Análise-Produtos e Serviços Para Laboratórios, pelo fornecimento dos kits para padronização do método.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dussault, J. H. and Laberge C. Thyroxine (T_4) determination in dried blood spot by RIA: a screening method for neonatal hypothyroidism? *Union Med. Can.* 1973;102: 2062.
2. Styne, D. M. Growth. In: Greenspan, F. S.; Baxter, J. D., eds. *Basic and Clinical Endocrinology*, 4th edition. Lange Medical Publishers. Connecticut. 1994:128-159.
3. Neto, E. C. Neonatal hypothyroidism screening with immunochemiluminometric assay of thyrotropin. *Clin. Chem.* 1991;37:1796.
4. Neto, E. C. and Schulte, J. Rapid and automated assay for thyrotropin in Guthrie cards on the ACS:180™. *Clin. Chem.* 1998;44:2372-73.
5. Neto, E. C. Quimioluminescência para TSH neonatal em papel filtro. *Rev Bras Anal Clin.* 1992; 24:108.
6. Neto, E. C.; Schulte, J. & Anele, E. V. Eighth years experience with an in-house luminescent test for TSH in Guthrie cards. Aceito para apresentação no 52nd American Association for Clinical Chemistry Annual Meeting & Clinical Laboratory Exposition e Abstract aceito para publicação em *Clin. Chem.* 2000 (6), suplemento.
7. Neto, E. C. & Schulte, J. Comparative study of TR-FIA and ICMA for TSH in blood spots. *Clin. Chem.* 1992;38:1092 (abstract);
8. Adam, B. W.; Alexander, J. R.; Smith, S. J.; Chace, D. H.; Loeber, J. G.; Elvers L. H. and Hannon, W. H. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume and paper matrix.
9. Newborn Screening Quality Assurance Program. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA, *Summary Report* 1998;15:2-3.
10. Ekins, R. P. Immunoassay Design and Optimisation. Em *Principles and Practice of Immunoassay*, 2^a edição. Price, C. P. & Newman, D. J. (eds), Stockton Press, NY, NY, 1997, páginas 175-209.
11. Naruse, H.; Watanabe, N.; Harada, S.; Ichihara, N.; Morikawa, M.; Mochizuki T. *et al.* Necessity of low cut off level of TSH in neonatal hypothyroid screening. *Proceedings of The 3rd International Screening Symposium*, October 21-24, 1996, Boston, MA, USA, pages 228-231.

Endereço para correspondência

Eurico Camargo Neto
Tel.: (0xx51) 336 1933 • Fax: (0xx51) 336 1933
E-mail: eneto.voy@zaz.com.br
nobelrie@zaz.com.br

Prevalência de triglicerídeos em pessoas de diversas faixas etárias da cidade de Manaus

Triglyceride's prevalence among people with different ages

Paulo Roberto Castro da Costa¹; Nívea Maria Pedroza Marques²; Edvar Fernandes Filho²; Tirza Peixoto Mattos²; Maria Rosa Lozano Borrás³; Ivete de Araújo Roland³ & Manoela Oliveira Lopes⁴

RESUMO - Atualmente, as hiperlipidemias são um dos principais fatores de risco para o infarto no miocárdio. Um dos objetivos básicos da pesquisa mundial sobre riscos cardiovasculares tem sido definir as médias de níveis lipídicos séricos e a prevalência de todos os tipos de hiperlipidemias na sociedade. O presente estudo, não é um estudo randomizado. Tem por finalidade mostrar o comportamento dos triglicérides em 4.359 pacientes examinados de janeiro a outubro de 1999. Os resultados indicam que o sexo feminino apresenta padrão de anormalidade a partir da faixa etária de 25 a 29 anos e no sexo masculino, a partir da de 20 a 24 anos de idade, o que vem sugerir, a necessidade de um controle mais efetivo, até que se determine o motivo desta alterabilidade. Os dados foram colhidos diretamente dos livros de registro de resultados do Laboratório de Bioquímica Clínica do Laboratório Central do Estado do Amazonas.

PALAVRA-CHAVE - Triglicerídeos.

ABSTRACT - Nowadays, the hyperlipidemias are one of the major risk factors of myocardial infarction. One of the fundamental goals in the world research on the cardiovascular risks factors has been to define the mean values of serum lipids levels and the prevalence of all kind of hyperlipidemia in the society. This paper, is not a randomized study. It has as principal goal, to show the profile of the triglycerides in the 4.359 patients screened between January to October, 1999. Our results point out that the female sex presented abnormal results from the 25 to 29 years old range and the male sex, from the 20 to 24 years old, suggesting a most effective biochemical control, until that will be discovered the actual reason for this alterability. The results were got directly from the results register book at Clinical Biochemistry Laboratory from the Amazon State's Central Laboratory.

KEY WORD - Triglycerides.

INTRODUÇÃO

Os triglicerídeos são formas químicas que existem na maioria dos alimentos e no corpo humano. Estão também presentes no plasma sanguíneo e, em associação com o colesterol, formam os lipídios plasmáticos^{1,14}.

São considerados componentes normais do sangue. Após as refeições, o corpo humano digere as gorduras de seu alimento e libera essas substâncias no fluxo sanguíneo. Eles são transportados para produzir energia ou ser armazenados como gorduras^{3,8,16,19,21,22}.

As calorias ingeridas na alimentação e não usadas imediatamente pelos tecidos são convertidas em triglicérides e transportadas para as células adiposas onde são armazenadas. Hormônios regulam a liberação de triglicerídeos do tecido adiposo, o que faz com que o corpo sinta necessidade de energia¹.

De acordo com pesquisas publicadas no *Journal of the American Heart Association*², altos níveis de triglicerídeos podem ser considerados um dos fatores de risco para ataques cardíacos.

Além disso, também podem influenciar no tamanho, densidade de distribuição e composição de Low Density Lipoprotein (LDL)^{2,7,8,9,10,11,12,13,21}.

É consenso, que valores elevados de triglicerídeos, estão relacionados no homem com o aumento do risco de doenças cardio-isquêmicas, independentemente dos demais fatores, tais como colesterol total e LDL-colesterol².

Por desconhecermos o perfil dessa variável em nossa população, e por não termos trabalhos científicos locais e regionais que servissem de parâmetro de referência, se pesquisou as hiperlipidemias em faixas etárias cada vez mais baixas, objetivando-se detectar precocemente riscos de acidentes cardiocerebrais^{6,17}.

Recebido em 29/6/2000
Aprovado em 22/8/2000

¹Professor do Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Amazonas Farmacêutico-Bioquímico do Laboratório Central do Estado do Amazonas

²Farmacêutico-Bioquímico do Laboratório Central do Estado do Amazonas

³Professora do Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Amazonas

⁴Acadêmica do Curso de Farmácia da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade do Amazonas
Rua Paraíba, BL-3/102, Adrianópolis, Manaus, AM, 69057-020

Determinou-se o perfil das hiperlipidemias, iniciando pelos triglicérides (4.347 resultados), de 19.875 exames realizados no Laboratório Central de Saúde Pública da Secretaria de Estado da Saúde do Estado do Amazonas, Brasil, no período de janeiro a outubro de 1999.

Sendo este parte de um amplo plano de pesquisa, reflete nossa preocupação com os valores dessa variável em nossa amostra, cujos valores médios situam-se acima da normalidade, quando comparados a valores encontrados na literatura especializada^{4,15,20}.

MATERIAL E MÉTODOS

As vidrarias utilizadas nas dosagens de triglicérides foram as convencionais na rotina laboratorial. A técnica enzimática - GPO-PAP - e reagentes foram as recomendadas para o equipamento computadorizado Vitalab Selectra 2.

A metodologia utilizada para coleta de dados foi extração direta do livro de registro de resultados e a apresentação das variáveis, por meio de estatística descritiva. A amostra foi composta pelo total de 4.347 de exames para triglicérides realizados no período de janeiro a outubro de 1999, pelo Laboratório Central do Amazonas, Brasil, independentemente de faixa etária, sexo ou origem dos pacientes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho, apresenta uma visão do perfil epidemiológico dos triglicérides na amostra estudada, e indica a partir de qual faixa etária há possibilidade de riscos para acidentes cardiovasculares, por resultados acima da normalidade, o que não prescinde de outros critérios de avaliação clínica por parte do médico (Tabela I).

São várias as técnicas de dosagem dos triglicérides e a literatura diverge quanto aos valores considerados normais no plasma sanguíneo^{4,16,20}. O *Second Expert Panel on the Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults*¹ definiu a hipertrigliceridemia como:

- Triglicérides normais menos do que 200mg/dl
- borderline - triglicérides elevados 200 a 400 mg/dl
- Triglicérides elevados 400 a 1000 mg/dl
- Triglicérides muito alto acima de 1000 mg/dl

Os valores normais de triglicérides segundo a técnica e o equipamento por nós utilizados, devem variar entre os limites de 35 a 110 mg/dl. Logo, valores que ficaram fora desses limites, foram considerados como anormais.

Os resultados estão expressos em valores médios mais desvio padrão da média de triglicérides por faixa etária e por sexo (Tabela I).

A Tabela I, nos dá os valores médios de triglicérides por faixa etária e por sexo, de 4.359 exames realizados nesta variável, sendo 2.822 no sexo feminino e 1.357 no sexo masculino.

Observa-se, nesta tabela, que a faixa etária do sexo feminino a partir da qual os valores ficaram acima dos limites de normalidade estabelecido pela técnica de dosagem usada, foi a de 25 a 29 anos e, no sexo masculino, na de 20 a 24 anos.

Interessante é o fato de que na faixa etária de 10 a 14 anos, em ambos os sexos, os valores médios situam-se no borderline, caminhando para a anormalidade.

Observa-se também, na Tabela, que a classe médi-

TABELA I
Valores médios de triglicérides por faixa etária e por sexo, no período de janeiro a outubro de 1999

Faixa etária Anos	Sexo				Total de exames
	Feminino		Masculino		
	Número de exames	Triglicérideos mg/dl	Número de exames	Triglicérideos mg/dl	
2 a 4	1	52 ± 0	5	112 ± 30	6
5 a 9	3	80 ± 12	5	96 ± 35	8
10 a 14	16	110 ± 79	11	113 ± 65	27
15 a 19	53	95 ± 43	51	99 ± 48	104
20 a 24	85	99 ± 44	81	111 ± 68	166
25 a 29	150	112 ± 81	149	127 ± 84	299
30 a 34	255	114 ± 66	141	161 ± 114	396
35 a 39	284	135 ± 98	140	169 ± 114	424
40 a 44	364	139 ± 100	164	180 ± 122	528
45 a 49	356	144 ± 87	155	170 ± 117	511
50 a 54	324	155 ± 96	140	181 ± 141	464
55 a 59	237	159 ± 107	147	174 ± 121	384
60 e acima	694	154 ± 83	348	147 ± 100	1042
Total de exames	2.822		1.537		4.359

ca concentra os pedidos de exames a partir da faixa etária de 30 a 40 anos de idade, com destaque para a de 60 anos e acima de 60.

Não há no Estado do Amazonas e são raras no Brasil, informações epidemiológicas sobre os fatores de risco para acidentes cardiovasculares nos moldes em que estamos propondo, ou seja, pesquisar todas as faixas etárias.

Apesar de raros, trabalhos desta natureza foram realizados por pesquisadores americanos, que concluíram que o aumento na adiposidade correspondeu a um aumento no colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides, e diminuiu o HDL-colesterol, aumentando assim, o risco de doenças cardiovasculares^{2,5,7,9,10,11,12,13,18,21}.

Sobre o comportamento dessa variável bioquímica nada se conhece em nosso Estado, principalmente na cidade de Manaus.

A análise dos dados da Tabela I, sugere um comportamento atípico de nossa amostra, que apresenta valores acima daqueles recomendados pelos padrões estrangeiros, portanto, situando-se na faixa da anormalidade, a partir das faixas etárias de 25 a 29 anos para o sexo feminino, e de 20 a 24 anos para o sexo masculino.

CONCLUSÃO

- 1) Comparando os resultados com os da literatura, observa-se que, apesar de atipicamente a faixa etária de 10 a 14 anos apresentar valores no borderline e ligeiramente acima dos valores normais estabelecidos para a respectiva faixa etária, as demais estão fora dos limites da normalidade, o que passa a exigir maior preocupação por parte dos médicos, haja vista que os dados indicam que concentraram seus pedidos de exames a partir da faixa etária de 30 a 34 anos para o sexo feminino e 25 a 29 anos para o sexo masculino.
- 2) Os resultados são preocupantes e sugerem que a classe médica deve concentrar, também, forte atenção nesse importante fator de risco para acidentes cardiovasculares e cerebrais, a partir da faixa etária de 20 a 24 anos.
- 3) Apesar da elevada variabilidade dos resultados nas faixas etárias, urge necessidade de controle epidemiológico da trigliceridemia e de outras hiperlipidemias em nosso Estado.
- 4) Os resultados sugerem ser possível determinar o padrão epidemiológico dos triglicérides em nossa população.

- 5) Os resultados indicam a necessidade de se determinar se esse padrão deve ser considerado padrão de atipicidade e anormalidade, para nossa população.
- 6) Os resultados indicam a necessidade de se determinar se esse padrão de atipicidade e anormalidade é consequência das diferenças sócio-econômicas e culturais de nossa população, ou, se tal comportamento é normal e próprio de nossas características nutricionais, que vivemos em ecossistema típico, isto é, de florestas tropicais úmidas, que, por sua própria natureza, tem suas peculiaridades.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Heart Association. *Triglycerides*, 1999. <http://unisci.com>
2. American Heart Association. *Triglycerides may be among heart attack high risk factors*, 24 de março de 1998. <http://unisci.com>
3. Champe, P. C. & Harvey A. R. *Bioquímica Ilustrada*, 2ª edição. Porto Alegre, 1997, p. 185.
4. Copper, G. R. Lipid Measurement Methodology: National Institutes of Health Consensus Conference. *Triglycerides, high-density lipoprotein and coronary heart disease*. JAMA 1993; 269:505-510.
5. Eis Shaina. NDC DCD 98/2. <http://www.nationaldairycouncil.org/medcent/692/>
6. Falkoff, A. Cardiovascular risk factors. E-mail: johnjune@wolfenet.com
7. Feeman Jr. W. E. Hypertriglyceridemia and Atherosclerosis. *Annals of Internal Medicine*, 1 January 1998.
8. Garret, H. R. & Grisham, C. M. *Biochemistry*. New York. Saunders College Publishing Harcourt Brace College Publishers. 1995. P. 279-280.
9. Ginsberg, H. N. Is hypertriglyceridemia a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease? A simple question with a complicated answer. *Annals of Internal Medicine*, 1 June 1997. 126:9:912-914
10. Griffith, H. W. Lipoprotein-Cholesterol Fractionation (Cholesterol; HDL & LDL; High-Density Lipoprotein & Low-Density Lipoprotein) from *Complete Guide to Medical Tests*. New York. 1988. Fisher Books. Medical Data Exchange.
11. Herman, Janice. *Diet and Heart Disease*. 24-7-1997. http://www.okstate.edu/OSU_Ag/agedcm4h/pearl/hes_pubs/health
12. Facts about cholesterol. 07-08-1997. http://www.okstate.edu/OSU_Ag/agedcm4h/pearl/hes_pubs/health
13. Journal of The American Medical Association. Long-term Cholesterol Effects of 4 fat-restricted diets in hypercholesterolemic and combined hyperlipidemic men. November 12, 1997. Volume 278, 1509-1515.
14. Kendall, P. All about triglycerides. october 8, 1997. <http://www.colostate.edu/Depts/CoopExt>
15. Miller, M. The epidemiology of triglycerides as a coronary artery disease risk factor. 1999-06-13. <http://clinical-cardiology.org/briefs/CC22S2/cc22S>
16. Murray, R. K.; Granner, D. K.; Mayes, P. A.; Rodwell, V. W. Harper: *Bioquímica*. Atheneu Ed. São Paulo. São Paulo. 1994, p. 146.
17. National Institute of Health Consensus Development Conference Statement Online - *Triglycerides, high density lipoprotein, and coronary heart disease*. 1992 Feb 26-28; 10(2):1-28.
18. Siervogel, R. M. How do body fat changes correlate with lipid changes. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 1998; 18:1759-1764. CardioConsult Reviews. Vol. 10: december, 1998.
19. Stryer, L. *Bioquímica*. Trad. João Paulo de Campos et alii. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan S.A. 1992. p. 388-389.
20. Uthman, E. *Interpretation of Lab test profiles*. 15 nov 1998. e-mail: uthman@neosoft.com
21. Vieira, E. C.; Gazinelli, G.; Mares-guia, M. *Bioquímica Celular e Biologia Molecular*. 2ª ed. Rio de Janeiro. Livraria Atheneu Editora. 1991, p. 23-25.
22. White, A.; Handler, P.; Smith E. L. *Princípios de Bioquímica*. 5ª Edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. S.A. 1976, p. 449-497.

1 a 5 de junho de 2001
Florianópolis
SC

XXVIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas

XV Congresso Latinoamericano de Bioquímica Clínica

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

Rua Vicente Licínio, 95 - Rio de Janeiro - RJ - 20270-902

Tel. (0xx21)234-4881 • Fax (0xx21)234-2053

www.cbac.org.br

Estabelecimento dos valores normais do RDW para a população de Curitiba

Corpuscular constant (RDW) as reference value for eritogram

Paulo H. da Silva¹, Mariella Zaroni², Samuel R. Comar³ & Hemerson B. Alves⁴

RESUMO - O RDW (red cell distribution width) é uma constante corpuscular que, atualmente, está incorporada ao eritograma de muitos contadores automatizados e que se reveste de uma importância muito grande na interpretação laboratorial das anemias. O valor de referência utilizado para a interpretação do RDW é o que acompanha os aparelhos e não o da nossa população. O presente trabalho estabelece o valor de referência para o RDW em nossa população.

PALAVRAS-CHAVE - RDW; valores de referência.

SUMMARY - The RDW (red cell distribution width) is an erythrocyte indice obtained from many analyzers, which is very useful in the laboratorial interpretation of anemias. In our population we don't have the references values for RDW, so, this paper has the finality to establish it.

KEY WORDS - RDW; corpuscular constant.

INTRODUÇÃO

O sangue é constituído de uma parte fluida, o plasma, e de uma parte sólida composta pelos elementos figurados (eritrócitos, leucócitos e plaquetas). O hemograma é o exame, dentro das análises clínicas, que faz a avaliação dos elementos figurados e é constituído pelo eritograma, leucograma e da avaliação numérica e morfológica das plaquetas. O RDW (*red cell distribution width* - variação da distribuição do tamanho eritrocitário) expresso como uma nova constante em muitos aparelhos de automação disponíveis no comércio atualmente, faz parte do eritograma.

O eritograma fornece a contagem de eritrócitos em milhões/microlitro, a concentração da hemoglobina em gramas/decilitro e o volume globular (VG) ou hematócrito (HT) com valores expressos em porcentagem. A diferença entre volume globular e hematócrito é que o primeiro é calculado a partir do VCM (volume corpuscular médio) em relação ao número de eritrócitos contados, cálculo este, efetuado nos aparelhos de automação que expressam o VG, e que na maioria das vezes não escrevem o termo volume globular e sim, erroneamente, hematócrito. Por sua vez, o hematócrito é realizado em centrifuga de microhematócrito, a qual centrifugou, por um determinado tempo e rotação, um tubo capilar preenchido com determinada quantidade

de sangue e vedado em uma das pontas. A diferença entre as duas metodologias é que no hematócrito permanece uma determinada quantidade de plasma, a qual fica retida entre os eritrócitos sedimentados pela centrifugação. No volume globular, calculado, esta quantidade de plasma residual não existe, isto faz com que haja uma diferença de valores, em torno de 3 a 4%, entre o VG e o HT, fazendo com que o HT seja maior que o VG. Com estas três determinações pode-se calcular as constantes corpusculares, cálculo feito por muitos aparelhos de automação em hematologia, as quais são: o volume corpuscular médio (VCM), a hemoglobina corpuscular média (HCM) e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM). O VCM, expresso em fentolitros, informa o tamanho médio dos eritrócitos, portanto, pelo seu valor sabe-se se os eritrócitos, na média, são macrocíticos, normocíticos ou microcíticos. O HCM, expresso em picogramas, indica, em valores absolutos (peso) a presença ou não de hipocromia. O CHCM se refere à concentração média de hemoglobina em porcentagem, sendo um valor relativo, também, indicativo de hipocromia. A constante que indica fielmente a intensidade da hipocromia é a hemoglobina corpuscular média.

Com estas três constantes pode-se classificar as anemias em microcíticas e hipocrômicas, macrocíticas e normocíticas e normocrômicas, obtendo-se, portanto, a

Recebido em 18/8/2000

Aprovado em 21/8/2000

¹Professor da disciplina de Hematologia II, Curso de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal do Paraná

²Acadêmica do Curso de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Monitora da disciplina 1998

³Acadêmico do Curso de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Monitor da disciplina 1999

⁴Farmacêutico Bioquímico, Perito Criminal, Instituto de Criminalística, Polícia Civil do Paraná

classificação morfológica das anemias. Se a esta classificação se adicionar a contagem de reticulócitos e o cálculo do índice de produção de reticulócitos, obtém-se a classificação morfofisiológica e pode-se ter indicação se a anemia em questão é hemolítica ou não.

Modelos mais recentes de contadores hematológicos introduziram ao eritrograma uma nova constante, o RDW. O aparelho sabe o tamanho de cada eritrócito por ele contado e sabe o número de eritrócitos contados, pode, portanto, calcular o VCM, que é a média do tamanho dos eritrócitos contados e ele sabe quanto cada eritrócito contado variou, em tamanho, a partir da média. O valor numérico que mostra o quanto cada eritrócito contado variou em tamanho a partir da média é o desvio padrão. Tendo-se o desvio padrão e a média pode-se calcular o coeficiente de variação. O valor numérico do desvio padrão ou do coeficiente de variação do VCM é representado pelo RDW, geralmente expresso pelo coeficiente de variação e, portanto, em porcentagem.

O RDW indica se a população eritrocitária, que está sendo analisada, é homogênea ou heterogênea, ou seja, se existe ou não variação de tamanho nesta população eritrocitária. O RDW é um índice que avalia numericamente a intensidade da anisocitose. Quanto maior o RDW mais heterogênea é a população eritrocitária e, portanto, mais intensa é a anisocitose. Quanto menor o RDW mais homogênea é a população eritrocitária e menos intensa ou não significativa é a anisocitose. O valor do RDW aliado à classificação morfofisiológica permite uma melhor interpretação das anemias, sendo principalmente útil nas anemias microcíticas e hipocrômicas.

Os valores considerados normais para o RDW são aqueles que acompanham os aparelhos de automação adquiridos no comércio e que podem ou não refletir os valores normais de nossa população.

MATERIAL E MÉTODOS

Material

Foram coletadas a vácuo, amostras sangüíneas, com EDTA K₃, de pacientes ambulatoriais com idade variando entre 18 a 60 anos, de ambos os sexos. As 400 amostras sangüíneas que compõem a população estudada apresentaram hemograma normal e sem alterações morfológicas eritrocitárias.

Método

As contagens foram realizadas em aparelho automatizado CellDyn 3000 SL da Abbott Laboratories. Antes da contagem as amostras foram homogeneizadas por cinco minutos.

RESULTADOS

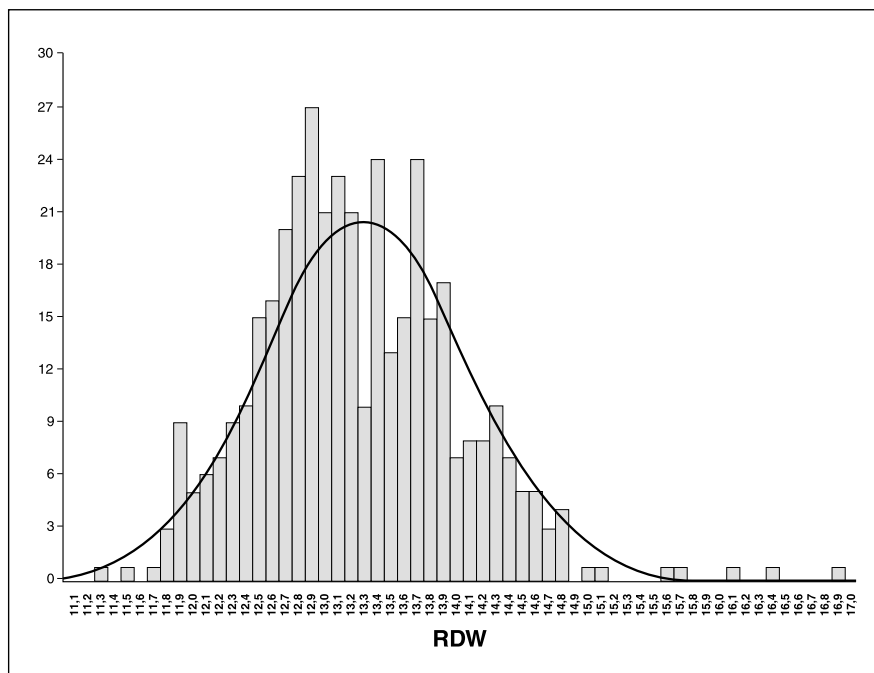
O Quadro 1 mostra os valores do RDW obtidos a partir da população estudada.

Os valores de RDW da população estudada foram plotados frente à frequência com que ocorriam, constituindo a curva de Gauss. A curva demonstrou, após a avaliação estatística, que a amostra representativa da população estudada segue a distribuição normal,

QUADRO 1
Valores de RDW obtidos
a partir da população estudada

01	13,2	81	13,8	161	11,9	241	13,8	321	13,8
02	13,4	82	13,9	162	13,9	242	11,5	322	12,6
03	13,4	83	13,8	163	13,3	243	12,9	323	13,1
04	14,3	84	14,4	164	12,9	244	12,4	324	13,0
05	12,2	85	13,3	165	13,4	245	12,6	325	13,3
06	13,4	86	14,1	166	14,3	246	12,4	326	12,7
07	13,2	87	12,9	167	14,2	247	12,6	327	12,3
08	13,7	88	12,5	168	12,9	248	12,3	328	12,3
09	13,8	89	12,2	169	13,1	249	13,6	329	12,6
10	13,1	90	14,2	170	13,6	250	13,0	330	12,8
11	14,6	91	13,4	171	14,4	251	13,2	331	11,7
12	13,5	92	15,1	172	13,5	252	13,4	332	12,8
13	13,7	93	13,2	173	12,4	253	13,6	333	13,7
14	13,4	94	13,1	174	13,5	254	12,8	334	12,9
15	12,9	95	13,0	175	13,7	255	12,9	335	12,5
16	13,6	96	12,8	176	12,5	256	13,3	336	12,6
17	12,8	97	14,7	177	13,4	257	14,3	337	12,8
18	13,1	98	12,9	178	13,7	258	12,9	338	12,8
19	12,1	99	13,6	179	13,1	259	12,9	339	12,7
20	13,8	100	13,1	180	12,9	260	14,5	340	12,9
21	12,7	101	13,3	181	11,9	261	12,7	341	12,9
22	14,3	102	12,4	182	14,5	262	12,8	342	13,0
23	13,4	103	12,0	183	13,6	263	12,7	343	12,0
24	12,9	104	12,6	184	14,3	264	15,0	344	12,9
25	14,8	105	14,5	185	12,7	265	12,5	345	13,0
26	13,4	106	13,4	186	12,4	266	11,9	346	13,1
27	12,5	107	14,7	187	14,0	267	12,3	347	13,0
28	12,8	108	13,9	188	13,7	268	13,2	348	13,4
29	12,5	109	13,7	189	13,2	269	12,9	349	13,3
30	12,0	110	11,9	190	13,7	270	12,6	350	13,2
31	13,0	111	14,5	191	13,8	271	12,3	351	12,4
32	13,0	112	16,1	192	12,7	272	13,3	352	12,9
33	14,0	113	13,8	193	14,4	273	13,2	353	12,9
34	13,4	114	12,7	194	13,5	274	16,9	354	12,5
35	13,0	115	14,1	195	12,9	275	12,5	355	13,6
36	12,6	116	14,1	196	13,8	276	13,0	356	12,7
37	13,1	117	13,0	197	13,0	277	12,8	357	13,2
38	13,7	118	13,8	198	11,9	278	15,7	358	12,2
39	13,9	119	13,6	199	14,0	279	11,8	359	12,3
40	13,4	120	12,4	200	12,8	280	12,7	360	11,9
41	13,2	121	13,0	201	13,7	281	11,8	361	12,7
42	13,4	122	13,8	202	13,2	282	12,7	362	12,7
43	12,2	123	13,4	203	12,6	283	12,8	363	13,1
44	13,8	124	13,9	204	12,7	284	14,7	364	13,6
45	14,3	125	13,7	205	13,5	285	13,5	365	13,7
46	13,5	126	14,3	206	12,2	286	12,6	366	14,5
47	12,8	127	13,6	207	13,1	287	13,2	367	12,1
48	14,4	128	13,9	208	12,9	288	14,0	368	13,2
49	12,8	129	12,9	209	14,4	289	13,7	369	13,7
50	13,6	130	12,7	210	13,0	290	13,0	370	12,9
51	13,0	131	12,8	211	13,9	291	13,0	371	14,1
52	13,0	132	14,6	212	14,6	292	14,1	372	13,0
53	13,4	133	15,6	213	13,2	293	13,1	373	13,3
54	11,9	134	13,9	214	14,6	294	12,3	374	12,7
55	12,2	135	13,9	215	12,6	295	12,5	375	13,4
56	13,9	136	13,8	216	13,7	296	13,1	376	12,1
57	12,8	137	13,6	217	12,6	297	13,1	377	13,4
58	13,8	138	13,8	218	12,9	298	12,6	378	13,2
59	12,7	139	13,7	219	12,7	299	12,8	379	13,5
60	13,1	140	13,5	220	13,4	300	13,5	380	14,2
61	14,2	141	13,7	221	12,6	301	13,6	381	12,0
62	12,4	142	14,1	222	12,5	302	14,2	382	14,0
63	14,0	143	13,1	223	11,3	303	12,1	383	11,8
64	14,3	144	14,8	224	14,1	304	12,7	384	13,1
65	12,6	145	13,1	225	13,9	305	13,4	385	12,8
66	13,2	146	12,5	226	12,0	306	14,3	386	14,2
67	12,8	147	14,6	227	12,5	307	14,0	387	13,5
68	11,9	148	12,9	228	12,3	308	13,6	388	13,3
69	13,9	149	14,8	229	12,8	309	13,7	389	13,7
70	13,1	150	12,9	230	12,5	310	14,3	390	13,7
71	13,8	151	13,1	231	14,1	311	13,1	391	13,8
72	13,2	152	13,9	232	12,0	312	13,0	392	14,2
73	12,5	153	12,4	233	12,2	313	13,9	393	13,7
74	13,3	154	13,1	234	12,6	314	13,2	394	13,5
75	14,4	155	13,2	235	12,8	315	13,5	395	13,7
76	13,7	156	13,2	236	13,2	316	14,3	396	13,9
77	14,2	157	14,4	237	13,4	317	13,4	397	12,7
78	14,8	158	12,9	238	11,9	318	12,3	398	12,1
79	12,9	159	12,5	239	13,4	319	12,1	399	12,4
80	13,1	160	13,6	240	13,8	320	13,7	400	13,9

FIGURA 1
Valores de RDW plotados
frente à frequência de ocorrência



ou seja, a frequência observada dos valores do RDW é menor que a frequência esperada dos mesmos. A figura 1 traz a representação da curva de Gauss.

O valor da média foi de 13,25 e do desvio padrão 0,78; deste modo, o valor normal de RDW para a população de Curitiba corresponde a $13,25 \pm 1,56$ (1,56 corresponde a 2 desvios padrões), variando entre 11,69 a 14,81 %.

DISCUSSÃO

O valor do RDW é bastante útil na interpretação e diferenciação das anemias. As anemias microcíticas e hipocrômicas, podem ser classificadas em hemolíticas e não hemolíticas. As anemias microcíticas e hipocrômicas não hemolíticas estão representadas pela anemia ferropriva, anemia sideroblástica e de doenças crônicas. As duas primeiras apresentam um RDW elevado, na medida em que a anemia se instala, a última por apresentar um mecanismo diferente de instalação, apresenta RDW normal e geralmente é normocítica e normocrômica. Nas anemias microcíticas e hipocrômicas hemolíticas estão as hemoglobinopatias, caracteristicamente as talassemias, que são doenças resultantes do déficit de produção das cadeias de globina alfa ou beta, e podem apresentar-se na forma homo ou heterozigota. As heterozigotas podem não apresentar anemia e as homozigotas apresentam quadro hemolítico severo. Geralmente, nas formas heterozigotas, o RDW está normal ou discretamente aumentado, enquanto que nas homozigotas está aumentado.

As anemias normocíticas e normocrômicas também se dividem em hemolíticas e não hemolíticas. As hemolíticas incluem as anemias por defeito de membrana (esferocitose, eliptocitose, estomatocitose, acanto-

citose e piropoiquilocitose), hemoglobinopatias (hemoglobinas de agregação, S e C), enzimopatias em crise hemolítica aguda (deficiência de G-6-PD e Piruvatoquinase), anemias hemolíticas de origem imunológica (isoimune, auto-imune e induzidas por medicamentos), hemoglobinúria paroxística noturna, hemoglobinas instáveis e as adquiridas, onde ocorre fragmentação eritrocitária (prótese cardíaca, microangiopática, infecções e queimaduras). Todo este grupo de anemias, com exceção da esferocitose, apresentam elevação no valor do RDW. Nas anemias normocíticas e normocrômicas não hemolíticas, como a insuficiência renal crônica, doenças endócrinas e problemas referentes à produção celular da medula óssea, apresentam RDW dentro de valores normais.

As anemias macrocíticas podem ser classificadas em megaloblásticas e não megaloblásticas. As megaloblásticas, caracterizam-se por déficit de vitamina B12 e ácido fólico, apre-

sentam RDW aumentado. As não megaloblásticas podem ser hemolíticas e estarem macrocíticas em função do aumento do número de reticulócitos, apresentam RDW aumentado. As macrocíticas não megaloblásticas como hepatopatias e problemas de produção a nível de medula óssea apresentam RDW normal.

O RDW tem um valor interpretativo muito útil na classificação morfofisiológica das anemias e daí a importância de se saber o seu valor normal na população com que se trabalha.

CONCLUSÃO

A partir da amostra estudada pode se estabelecer o valor normal do RDW na população de Curitiba, obtendo-se como valor médio 13,25%, com uma variação de mais ou menos dois desvios padrões de 1,56%.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bessman, S. D.; Gilmer, J. R. & Gardner, F. H. Improved classification of anemias by MCV and RDW. *Am. J. Clin. Pathol.*, 80:322-326, 1983.
2. Beutler, E.; Lichtman, M. A.; Coller, B. S. & Kipps, T. J. *Williams Hematology*. 5th ed. New York: McGrawHill, 1995.
3. Bollinger, P. B.; Drewinko, B.; Brailas, C. D.; Smeeton, N. A. & Trujillo, J. M. The technicon H1-Na automated hematology analyzer for today and tomorrow. *Am. J. Clin. Pathol.*, 87: 71-78, 1987.
4. Grotto, H. J. W.; Carneiro, M. V.; Dezotti, B. H. C. & Kimura, E. Utilidade do RDW e da curva de distribuição eritrocitária no diagnóstico das anemias. *Rev. Bras. Pat. Clín.*, nº 4, 1994.
5. Lee, G. R.; Bithell, T. C.; Foerster, J.; Athens, J. W.; Lukens, J. N. *Wintröbe's Clinical Hematology*. 9th ed. v.1, Philadelphia: Lea & Febiger, 1993.
6. Silva, P. H. & Hashimoto, Y. *Interpretação Laboratorial do Eritrograma*. Editora Lovise, São Paulo, 1999.
7. Stiene-martin, E. A.; Lotspeich-steininger, C. A. & Koepke, J. A. *Clinical Hematology: Principles, Procedures, Correlations*. 2nd ed. New York: Lippincott, 1998.
8. Vallada, E. P. *Manual de Técnicas Hematológicas*. São Paulo: Atheneu, 1988.