

# RIBAC

## REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

### SUMÁRIO

- Micrométodo para extração de DNA genômico útil no diagnóstico molecular da Hipercolesterolemia Familiar** ..... 111  
*Luis A. Salazar, Carlos E. Melo, Selma A. Cavalli, Hamilton M. Hinuy, Mario H. Hirata & Rosario D. C. Hirata*  
 A micromethod for DNA extraction useful in the molecular diagnostic of Familial Hypercholesterolemia
- HPV na gênese de lesões cérvico-uterinas - Métodos diagnósticos (Citopatologia - Tipagem viral)** ..... 117  
*Marcia Elena Zamin Bringhenti, Thissiane de Lima Gonçalves & Yarema Bedin Rodrigues*  
 HPV in the genesis of cervico uterine lesions - Methods diagnosis (Cytopathological - Viral type)
- Glicemia em jejum como critério diagnóstico para o Diabetes mellitus correlacionada com o perfil lipídico** ..... 121  
*Magda P. P. Nascimento; Marileia Scartezini; Vânia M. Alcântara; Cyntia M. T. Fadel-Picheth & Geraldo Picheth*  
 Fasting glycemia as Diabetes mellitus diagnostic criterion and the correlation with the lipid profile
- Avaliação imunológica e hematológica de pacientes com doença linfoproliferativa crônica** ..... 127  
*Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior; Valéria Soraya de Farias Sales; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca; Maria Zélia Fernandes; Aldair de Souza Paiva; Francisco Fernandes do Nascimento Júnior; Maria Cleide de Araújo Lopes; Roberto Chaves de Vasconcelos & Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva*  
 Immunological and hematological avaliation of patients with chronic lymphoproliferative disease
- O laboratório de análises clínicas na prevenção da formação de cálculo renal** ..... 137  
*Marlene Leiko Doi Sakuno, Gisele Takahachi, Mary Mayumi Taguti Irie & Tatiana Shioji Tiunan*  
 The clinical chemistry laboratory in the prevention of renal stone formation
- Hematuria, hemoglobinúria e mioglobinúria na rotina do laboratório clínico - "compreender é preciso"** ..... 139  
*C. L. Melo & M. G. R. Queiroz*  
 Hematuria, hemoglobinuria and mioglobinuria in the clinical laboratory routine - "It is necessary to understand"
- Estudos hematológicos e bioquímicos em *Rattus norvegicus* (Wistar) submetidos à ação do veneno de *Dirphia* sp.** ..... 143  
*T. A. Castaman; A. Lunardelli; R. C. V. Santos; M. Assis; R. N. Moresco & J. R. Oliveira*  
 Hematological and biochemical studies in *Rattus norvegicus* (Wistar) submitted to the *Dirphia* sp. (*Lepidoptera*, *Saturniidae*) venom
- As moléculas de adesão e a patogênese das doenças reumáticas sistêmicas** ..... 149  
*Carolina Ferrufino, Shirley Rosa Utiyama & Sérgio S. Siqueira*  
 The adhesion molecules and the pathogenesis of systemic rheumatic diseases
- Aplicação do "Elisa-conta" no diagnóstico da pitiose** ..... 155  
*Sydney Hartz Alves; Cecília S. Boettcher; Alexandre T. Leal; Adriana Monteiro Leal; José E. P. Silva; Janio M. Santurio*  
 The use of "Elisa-conta" (Elisa-beads) in pitiosis diagnosis
- Bacteriúria assintomática: principais aspectos** ..... 159  
*Éryka Helena Trapp & Beatriz Schlatter Hasenack*  
 Asymptomatic bacteriuria: main aspects

# 3

VOLUME 33

2001

# Micrométodo para extração de DNA genômico útil no diagnóstico molecular da Hipercolesterolemia Familiar\*

## A micromethod for DNA extraction useful in the molecular diagnostic of Familial Hypercholesterolemia

Luis A. Salazar<sup>1,2</sup>, Carlos E. Melo<sup>1</sup>, Selma A. Cavalli<sup>1</sup>, Hamilton M. Hinuy<sup>1</sup>, Mario H. Hirata<sup>1</sup> & Rosario D. C. Hirata<sup>1</sup>

**RESUMO** – Os métodos para extração de DNA empregados hoje em dia na rotina laboratorial, utilizam grandes volumes de sangue, o que constitui um problema quando se usam amostras pediátricas. Outros métodos envolvem várias etapas, não sendo adequadas a para rotina laboratorial. No presente trabalho, foi desenvolvido um método rápido de extração de DNA de sangue total para pequenos volumes de amostra. Brevemente, volumes iguais de sangue total e NaI a 6M foram misturados. A seguir, as proteínas e debris celulares foram removidas por adição de uma mistura de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1). O DNA foi isolado da fase aquosa e purificado com isopropanol. Amostras de DNA foram também extraídas pelo método de precipitação salina, previamente desenvolvido em nosso laboratório. A quantificação e a pureza do DNA foram realizadas por espectrofotometria em 260 e 280 nm, sendo a sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose a 1%. A quantidade de DNA de sangue total obtida pelo método proposto foi 1,5 vezes superior à obtida pela técnica de precipitação salina ( $28,6 \pm 7,8$  vs.  $19,1 \pm 3,5 \mu\text{g/ml}$  de sangue, respectivamente;  $p=0,0003$ ). A pureza do DNA foi também superior ( $A_{260/280}=1,73 \pm 0,18$  vs.  $1,61 \pm 0,06$ , respectivamente;  $p=0,0164$ ). Utilizando o DNA extraído pelo micrométodo, obtivemos sucesso na triagem de alterações genéticas no receptor da LDL e na apolipoproteína B em pacientes com Hipercolesterolemia Familiar (HF). Em resumo, o procedimento de extração de DNA é simples, rápido e aplicável para obtenção de DNA genômico de alta qualidade em 30 minutos, sendo portanto, útil no diagnóstico molecular da HF.

**PALAVRAS-CHAVE** – Extração de DNA; Hipercolesterolemia Familiar; triagem molecular; polimorfismos genéticos.

**SUMMARY** – Routine methods for DNA extraction from blood generally require large amounts of blood, what is a problem for pediatric samples. Other methods involve several steps that are not suitable in the clinical laboratory routine. To overcome these problems, we optimized a method for extracting DNA using small volume of whole blood. This method is based on the treatment of EDTA-anticoagulated whole blood with an equal volume of 6M NaI followed by chloroform: isoamyl alcohol extraction to clear hemoglobin and cell debris. The clear aqueous layer is then mixed with isopropanol to isolate genomic DNA. DNA samples were also obtained by salting-out method previously optimized in our laboratory. Quantification and purity of the DNA samples were determined by spectrophotometry at 260 and 280 nm. DNA integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis. The amount of DNA recovered by the micromethod was 1.5-fold higher than salting-out method ( $28.6 \pm 7.8$  vs.  $19.1 \pm 3.5 \mu\text{g/ml}$  of blood, respectively;  $p=0.0003$ ). The DNA purity assessed by the  $A_{260/280}$  ratio was also higher ( $1.73 \pm 0.18$  vs.  $1.61 \pm 0.06$ ;  $p=0.0164$ ). Using this micromethod for DNA extraction, we have successfully screened molecular variations in the LDL receptor and Apolipoprotein B genes in-patients with Familial Hypercholesterolemia (FH). A large number of samples can easily be handled by this extraction procedure lasts only 30 min. Therefore, this method is applicable to molecular diagnosis of FH.

**KEYWORDS** – DNA extraction; Familial Hypercholesterolemia; molecular screening; genetic polymorphisms.

### INTRODUÇÃO

**A** Hipercolesterolemia Familiar (HF) é uma doença de herança autossômica dominante, que se apresenta na população com uma frequência aproximada de 1/500 indivíduos na sua forma heterozigota e 1/1.000.000 na forma homozigota<sup>8</sup>. No Brasil, estima-se que existem 3.200.000 portadores heterozigotos para essa doença<sup>28</sup>. A HF é causada por mutações no gene

do receptor da lipoproteína de baixa densidade (RLDL)<sup>10,11</sup>, que produzem alterações estruturais ou funcionais do RLDL, que levam invariavelmente à doença arterial coronariana prematura, por aumento do colesterol sanguíneo<sup>3</sup>.

A HF é usualmente diagnosticada em bases clínicas, sendo os principais critérios: a hipercolesterolemia grave, a presença de xantomas tendinosos e de doença coronariana prematura<sup>8</sup>. Entretanto, através

Recebido em 16/7/2001  
Aprovado em 3/8/2001

\*Prêmio SBAC – XV Congresso Latinoamericano de Bioquímica Clínica e XXVIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2001 - Florianópolis, SC

<sup>1</sup>Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

<sup>2</sup>Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

desses critérios pode ser difícil distinguir a HF de outras doenças que também desenvolvem hipercolesterolemia. Como a HF é causada por mutações no gene do RLDL, os estudos genéticos moleculares são os mais indicados para estabelecer o diagnóstico adequado, principalmente para o diagnóstico pré-natal da HF<sup>28</sup>.

O uso de técnicas de Biologia Molecular nos laboratórios clínicos está se tornando cada vez mais frequente, especialmente no diagnóstico molecular das doenças hereditárias, como a HF. Entretanto, essas técnicas requerem de métodos de extração de DNA rápidos e eficientes para processar grande número de amostras. Muitos dos métodos já desenvolvidos para esse fim consomem tempo<sup>9,13,23,26</sup>, envolvem a digestão com Proteinase K ou *Nagarse*<sup>9,15,26,31</sup>, incubações com RNase para remover o RNA<sup>7</sup>, requerem um grande volume de sangue (10-15 ml), o qual constitui um problema quando são analisadas amostras pediátricas. Adicionalmente, nesses métodos são empregados solventes orgânicos, como o fenol<sup>13,24</sup>, que é altamente tóxico. Embora esses métodos recuperem o DNA de alto peso molecular de uma grande variedade de amostras biológicas, eles requerem várias etapas, incluindo a transferência dos extratos de DNA para outros tubos ou a utilização de procedimentos de purificação do DNA<sup>7,9</sup>, que aumentam o risco de troca de amostras e da introdução de contaminantes. Considerando estes aspectos, essas técnicas mostram-se pouco apropriadas para uso na rotina laboratorial.

Com o objetivo de desenvolver um método de extração de DNA genômico, aplicável a pequenos volumes de amostra, otimizamos a técnica desenvolvida previamente por Loparev e cols. em 1991<sup>14</sup>. O DNA extraído por este método foi submetido às técnicas de PCR-RFLP e PCR-SSCP, empregadas na identificação ou detecção de alterações genéticas do RLDL e da apolipoproteína B (apo B), que permitem o diagnóstico molecular da HF<sup>17,28</sup>.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Amostragem

Amostras de sangue total, coletadas em tubos contendo EDTA (1 mg/ml) como anticoagulante, foram obtidas de 20 indivíduos aparentemente saudáveis, para a otimização e avaliação estatística do micrométodo de extração de DNA, proposto neste trabalho. Foram também coletadas amostras de sangue total de 25 indivíduos com diagnóstico clínico e laboratorial de Hipercolesterolemia Familiar heterozigótica, provenientes do Serviço de Ambulatório do Instituto do Coração da Universidade de São Paulo (São Paulo, SP) para validar o procedimento. Todos os indivíduos participantes desse estudo assinaram o termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

### 2. Métodos

#### 2.1. Extração do DNA genômico

##### 2.1.1. Método de precipitação salina

O método de precipitação salina ou *salting-out*<sup>23</sup>, desenvolvido previamente em nosso laboratório, foi utilizado como método de referência. Brevemente, 1 ml de sangue total foi submetido à lise celular com 900 µl

do tampão de lise 1 (Tris-HCl a 10 mM [pH 8,0], KCl a 10 mM, MgCl<sub>2</sub> a 10 mM, EDTA a 2 mM [pH 8,0]) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 µl do tampão de lise 2 (Tris-HCl a 10 mM [pH 8,0], KCl a 10 mM, MgCl<sub>2</sub> a 10 mM, EDTA a 2 mM [pH 8,0], NaCl a 400 mM) contendo SDS a 1%. As proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µl de NaCl a 5M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação etanólica e finalmente, ressuspensionado em 100 µl do tampão TE (Tris-HCl 10 mM e 1mM EDTA [pH 8,0]) e armazenado a -20 °C.

##### 2.1.2. Micrométodo

Em um tubo de microcentrífuga estéril, 300 µl de sangue total foram adicionados a igual volume de iodeto de sódio a 6 M, que promoveu a lise celular. A seguir, a mistura foi homogeneizada em agitador de tubos por 20 s e adicionou-se 600 µl da mistura recém preparada de clorofórmio/álcool isoamílico (v/v, 24:1) para extração das proteínas e debris celulares. Homogeneizou-se em agitador de tubos por 20 s e centrifugou-se a 10.700 x g, por 5 min, à temperatura ambiente (TA). A seguir, removeu-se cuidadosamente a fase aquosa (superior) e transferiu-se para outro microtubo estéril. Adicionou-se 400 µl de isopropanol gelado e incubou-se por 3 min para precipitação do DNA genômico. Centrifugou-se a 10.700 x g, por 5 min, a TA e descartou-se o sobrenadante. O sedimento foi lavado com isopropanol a 37% e centrifugado a 10.700 x g, por 5 min, a TA. O isopropanol foi removido e o sedimento foi seco ao ar. Finalmente, o DNA foi ressuspensionado em 100 µl de tampão TE (pH 8,0), incubado por 10 min, a 56°C e armazenado a -20 °C.

##### 2.2. Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico

A integridade das moléculas de DNA de alto peso molecular, obtidas por ambos os métodos, foi verificada por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris a 90 mM, ácido bórico a 90 mM e EDTA a 2 mM) corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). A separação eletroforética foi realizada a 100 V por 45 min e a visibilização das bandas de DNA foi feita em transiluminador sob luz ultra-violeta<sup>24</sup>.

A quantificação e análise do grau de pureza (relação A<sub>260/280</sub>) dos extratos de DNA foram realizadas em espectrofotometro Beckman DU 640 (EUA), após diluição das amostras (1:50) em tampão TE<sup>24</sup>.

##### 2.3. Aplicações do DNA obtido pelo micrométodo

Com o objetivo de avaliar a qualidade do DNA e a presença de interferentes na reação de amplificação, o DNA obtido pelo micrométodo foi utilizado em diferentes técnicas que permitem identificar alterações genéticas, úteis no diagnóstico molecular da Hipercolesterolemia Familiar.

##### 2.3.1. Detecção da mutação 3500Q do gene da Apo B-100 por PCR-RFLP

Com a finalidade de identificar os indivíduos com Apolipoproteína B-100 Defeituosa Familiar (FDB),

doença que também causa hipercolesterolemia grave<sup>16,25</sup>, as amostras de DNA dos pacientes portadores de HF foram submetidas à triagem da mutação 3500Q do gene da apolipoproteína B-100, utilizando a técnica de PCR seguida de restrição enzimática, descrita recentemente por Cavalli e cols. (2001)<sup>4</sup>.

### 2.3.2. Análise da polimorfismo MspI do gene do RLDL por PCR-RFLP

Para a detecção do polimorfismo MspI do gene do RLDL, utilizado como marcador genético da HF<sup>2,5</sup>, amostras de DNA foram submetidas à amplificação do exon 15 do gene do RLDL pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores descritos por Hobbs e cols. em 1992<sup>11</sup>. Os produtos de PCR foram submetidos à restrição enzimática com 5 U da enzima MspI (Amersham Life Science) por 6 horas à 37°C. Os produtos amplificados, bem como os digeridos com a enzima MspI, foram analisados em gel de agarose a 2% e 3%, respectivamente.

### 2.3.3. Detecção da mutação P664L no gene do RLDL por PCR-RFLP

Para a detecção da mutação P664L no gene do RLDL, a qual tem sido indicada como causa de HF em diferentes populações<sup>10, 22</sup>, amostras de DNA foram submetidas à amplificação do exon 14 do gene do RLDL pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores descritos por Hobbs e cols. em 1992<sup>11</sup>. Os produtos de PCR foram submetidos à restrição enzimática com 6 U da enzima PstI (Life Technologies do Brasil) por 6 horas à 37°C. Os produtos amplificados, bem como os digeridos com a enzima, foram analisados em gel de agarose 2% e 3%, respectivamente.

### 2.3.4. Triagem de alterações genéticas no exon 12 do RLDL por PCR-SSCP

Para a triagem de alterações moleculares no exon 12 do gene do RLDL, as amostras de DNA foram submetidas a amplificação pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores descritos por Hobbs e cols. em 1992<sup>11</sup>. A seguir, os produtos de PCR foram analisados pela técnica de polimorfismo conformacional da fita simples (SSCP), descrita originalmente por Orita e cols. (1989)<sup>18</sup>. Brevemente, os produtos de amplificação foram desnaturados com uma solução de formamida 95%, EDTA 20 mM e xilenocianol 0,05% por 8 minutos a 95°C e imediatamente resfriados a 4°C. A seguir, submetidos à separação eletroforética em gel de poliácridamida 12,5% a 8°C, por 3 horas a 300 volts, empregando o sistema GenePhor da Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Suécia). Finalmente, os géis foram revelados pela coloração com nitrato de prata<sup>24</sup>.

### 2.4. Controle de qualidade das análises moleculares

As amplificações realizadas pela técnica de PCR, foram monitoradas utilizando-se um controle de reagentes (tubo no qual são adicionados todos os reagentes para a reação de amplificação, exceto o ácido nu-

**TABELA II**  
Concentrações de DNA genômico e grau de pureza (relação  $A_{260/280}$ ) obtidas pelo micrométodo e pela técnica de precipitação salina

Métodos	Concentração de DNA ( $\mu\text{g/ml}$ sangue)	Grau de pureza (Relação $A_{260/280}$ )
<b>Precipitação salina (n=20)</b>		
Média $\pm$ DP	19,1 $\pm$ 3,5	1,61 $\pm$ 0,06
Faixa	14,8 – 26,0	1,54 – 1,79
<b>Micrométodo (n=20)</b>		
Média $\pm$ DP	28,6 $\pm$ 7,8*	1,73 $\pm$ 0,18**
Faixa	16,7 - 44,6	1,53 - 2,10

\* $p=0,0003$  e \*\* $p=0,0164$ ; quando comparado ao método de precipitação salina (Teste "t" de Student)

**TABELA II**  
Valores de média, DP e CV intra-ensaio dos métodos utilizados para extração de DNA genômico de sangue total

Parâmetros	Métodos	
	Precipitação salina	Micrométodo
Média, $\mu\text{g/ml}$ sangue	40,90	61,7
DP, $\mu\text{g/ml}$ sangue	2,62	5,95
CV intra-ensaio*	6,40%	9,6%

\* Em 20 determinações

cléico), em cada conjunto de reações. Também foram repetidas 10% das reações de PCR, aleatoriamente. Para avaliar a eficiência das enzimas de restrição, amostras apresentando homozigose para o sítio de restrição em estudo, foram analisadas conjuntamente.

### 2.5. Análise estatística

Foram estimadas a média aritmética (média), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação intra-ensaio (CV) para os resultados de quantificação do DNA genômico. O teste "t" de Student foi empregado para a comparação dos resultados obtidos pelos dois métodos.

## RESULTADOS

A Tabela I apresenta as concentrações de DNA e as relações de absorvância em 260 e 280 nm (relação  $A_{260/280}$ ) obtidas das amostras de sangue total após análise espectrofotométrica. Como se pode observar, as amostras de DNA apresentaram grau de pureza ( $A_{260/280}$ ) que variou de 1,53 a 2,10. Ao avaliar as concentrações de DNA obtidas pelo micrométodo, observamos que os valores encontrados foram 1,5 vezes superiores aos obtidos pela técnica de precipitação salina ( $p=0,0003$ ). Resultado semelhante foi observado, quando foram comparados os graus de pureza ( $A_{260/280}$ ) dos extratos de DNA. As relações de  $A_{260/280}$  obtidas pelo micrométodo foram maiores que às obtidas pela técnica de precipitação salina ( $p=0,0164$ ).

Na Tabela II são mostrados os valores de média, desvio padrão (DP) e coeficientes de variação (C.V.) intra-ensaio dos métodos empregados para extração de DNA genômico de sangue total.

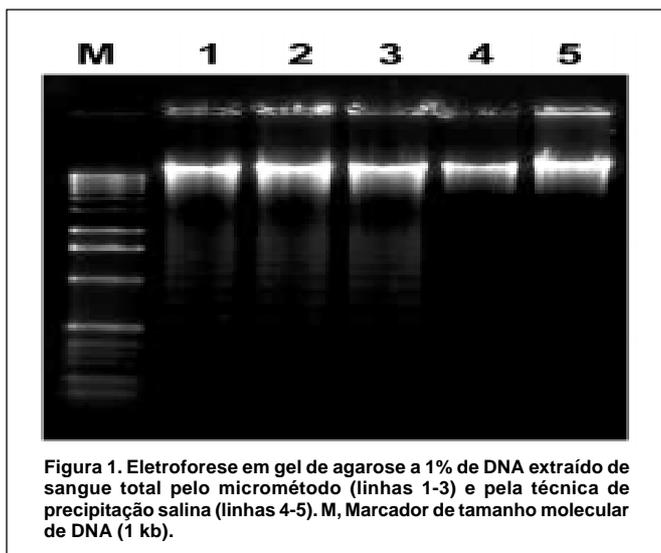


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA extraído de sangue total pelo micrométodo (linhas 1-3) e pela técnica de precipitação salina (linhas 4-5). M, Marcador de tamanho molecular de DNA (1 kb).

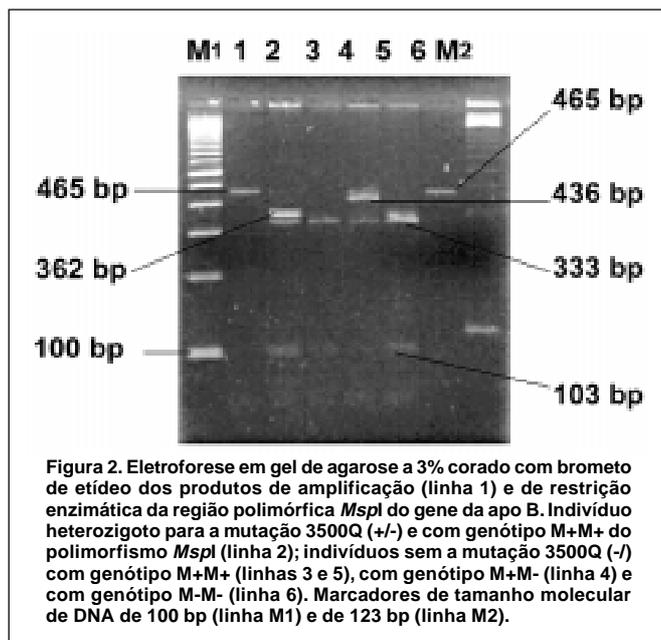


Figura 2. Eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo dos produtos de amplificação (linha 1) e de restrição enzimática da região polimórfica *MspI* do gene da apo B. Indivíduo heterozigoto para a mutação 3500Q (+/-) e com genótipo M+M+ do polimorfismo *MspI* (linha 2); indivíduos sem a mutação 3500Q (-) com genótipo M+M+ (linhas 3 e 5), com genótipo M+M- (linha 4) e com genótipo M-M- (linha 6). Marcadores de tamanho molecular de DNA de 100 bp (linha M1) e de 123 bp (linha M2).

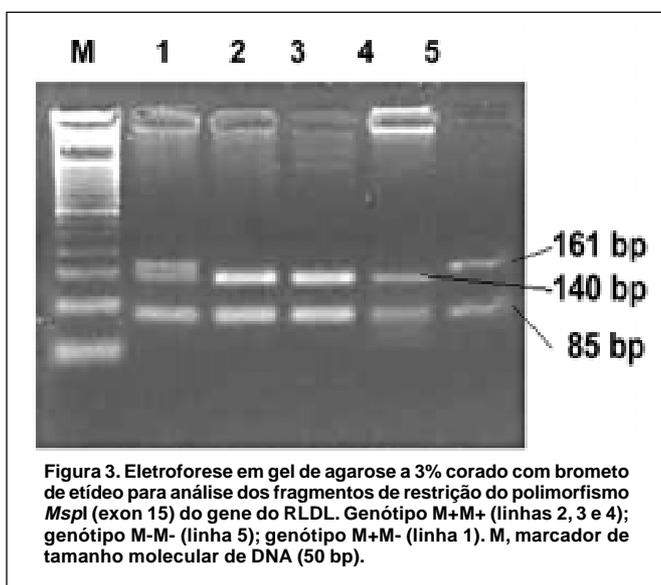


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo para análise dos fragmentos de restrição do polimorfismo *MspI* (exon 15) do gene do RLDL. Genótipo M+M+ (linhas 2, 3 e 4); genótipo M-M- (linha 5); genótipo M+M- (linha 1). M, marcador de tamanho molecular de DNA (50 bp).

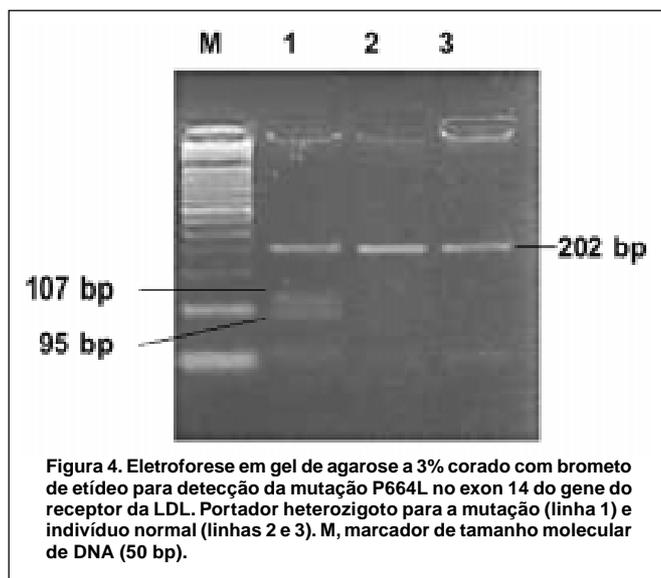


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídeo para detecção da mutação P664L no exon 14 do gene do receptor da LDL. Portador heterozigoto para a mutação (linha 1) e indivíduo normal (linhas 2 e 3). M, marcador de tamanho molecular de DNA (50 bp).

Na Figura 1 é apresentada a avaliação eletroforética em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídeo, das amostras de DNA extraído de sangue total pelos métodos avaliados.

A Figura 2 ilustra a análise dos produtos de amplificação e digestão com a enzima *MspI* de um fragmento do exon 26 do gene da apo B. Este procedimento permite identificar a mutação 3500Q e um sítio polimórfico para *MspI* no referido exon. A amplificação do DNA genômico para essa região resulta em um fragmento de 465 bp (Figura 2, linha 1). Na presença da mutação 3500Q e do sítio polimórfico para *MspI* são produzidos fragmentos de 362 bp, 333 bp, 103 bp e 29 bp (Figura 2, linha 2), caracterizando a presença da mutação 3500Q em sua forma heterozigota (+/-) e o genótipo M+M+ do polimorfismo *MspI*. Na ausência da mutação 3500Q, são observados os fragmentos de 333 bp, 103 bp e 29 bp para os indivíduos com genótipo M+M+ do polimorfismo *MspI* (Figura 2, linhas 3 e 5), os fragmentos de 436 bp, 333 bp, 103 bp e 29 bp, para os indivíduos com genótipo M+M- (Figura 2, li-

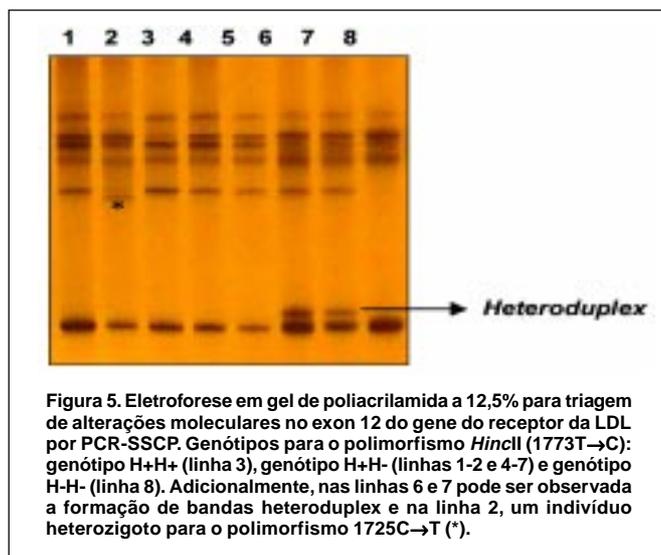


Figura 5. Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12,5% para triagem de alterações moleculares no exon 12 do gene do receptor da LDL por PCR-SSCP. Genótipos para o polimorfismo *HincII* (1773T->C): genótipo H+H+ (linha 3), genótipo H+H- (linhas 1-2 e 4-7) e genótipo H-H- (linha 8). Adicionalmente, nas linhas 6 e 7 pode ser observada a formação de bandas heteroduplex e na linha 2, um indivíduo heterozigoto para o polimorfismo 1725C->T (\*).

nha 4) e o fragmento de 465 bp para os indivíduos com genótipo M-M- (Figura 2, linha 6).

Na Figura 3, podemos observar a análise do polimorfismo *MspI* (exon 15) do gene do RLDL. O genótipo homocigoto M+M+ é identificado pela presença de três fragmentos, 141 bp, 85 bp e 21 bp (linhas 2, 3 e 4). Enquanto que no genótipo homocigoto M-M- observa-se a presença de dois fragmentos, 161 bp e 85 bp (linha 5). O genótipo heterocigoto M+M- é caracterizado pela presença de quatro bandas: 161 bp, 140 bp, 85 bp e 21 bp (linha 1).

Na Figura 4, é apresentada a análise da mutação P664L do gene do RLDL. O indivíduo homocigoto para a mutação é identificado pela presença de dois fragmentos, um de 107 bp e outro de 95 bp. Enquanto que no indivíduo normal observa-se apenas um fragmento de 202 bp (linhas 2-3). O indivíduo heterocigoto é caracterizado pela presença de três bandas: 202 bp, 107 bp e 95 bp (linha 1).

Na Figura 5, observamos a triagem de alterações genéticas no exon 12 do RLDL pela técnica de PCR-SSCP. Essa técnica possibilitou a identificação de dois polimorfismos previamente descritos no exon 12 do gene do RLDL<sup>5,20</sup>; o polimorfismo 1725C→T e o polimorfismo 1773T→C, que cria o sítio de restrição para a enzima *HincII*. Adicionalmente, nas linhas 6 e 7 podemos observar a formação de bandas heteroduplex, resultante da hibridação entre uma fita normal e uma fita mutada de DNA, após a desnaturação por 8 min a 95°C. Essas formações são altamente indicativas da presença de mutações, entretanto devem ser confirmadas e identificadas pela técnica de seqüenciamento de DNA.

## DISCUSSÃO

Uma das etapas importantes que limitam o uso e a eficiência das técnicas moleculares na rotina laboratorial é a extração do DNA genômico. Os métodos correntes utilizam grandes volumes de amostra ou envolvem muitas etapas no procedimento para obter o DNA<sup>6,7,9,12,13,14,15,19,23,26,31</sup>, características que tornam esses procedimentos inadequados para seu uso no laboratório clínico. O método proposto neste trabalho, é um procedimento simples, rápido e utiliza pequenos volumes de amostra, sendo então apropriado para uso no diagnóstico laboratorial das doenças genéticas, principalmente no período neo-natal.

Na extração do DNA, uma das etapas mais importantes do procedimento é a lise das células sangüíneas. Vários reagentes podem ser utilizados para esta finalidade, podemos citar a proteinase K e a Nagarse na presença de detergentes não iônicos (Nonidet P<sub>40</sub>, Triton X-100, entre outros)<sup>13,23,31</sup>; o emprego de substâncias desnaturantes, como o cloridrato ou o isotiocianato de guanidina<sup>12</sup>, ou ainda, o uso de substâncias caotrópicas, como os sais de sódio em alta concentração<sup>14,19</sup>.

A utilização de NaI a 6 M, na etapa de lise das células sangüíneas, foi descrita originalmente por Loparev e cols. em 1991<sup>14</sup>, para pequenos volumes de sangue anticoagulado com heparina. Entretanto, já é ampla-

mente conhecido, que dependendo da concentração de heparina presente nos extratos de DNA, ocorre a inibição da amplificação na técnica de PCR<sup>1,30</sup>. Outra limitação importante do método proposto por Loparev e cols.<sup>14</sup> é o reduzido volume de amostra utilizado. Considerando, que os estudos genéticos para triagem de alterações moleculares, envolvem geralmente a amplificação de todos os exons do gene de interesse, a quantidade de DNA obtida de volumes de sangue de 10 a 100 µl, pode não ser suficiente para realizar essas pesquisas, fazendo necessária a extração de várias alíquotas de uma mesma amostra, o que encarece o ensaio.

No micrométodo proposto neste trabalho, é utilizado sangue coletado com EDTA, evitando assim a interferência da heparina na técnica de PCR. Além disso, o volume de sangue utilizado (300 µl), permite a extração de DNA em quantidade suficiente para a realização de vários testes moleculares. Essas modificações permitiram aumentar a precisão e a praticabilidade do método.

A avaliação eletroforética do DNA extraído pelo o micrométodo mostrou que o procedimento realizado permite a extração de moléculas integras de DNA e sem contaminação com RNA, comparável ao método de precipitação salina (Figura 1). O grau de pureza do DNA extraído, verificado pela relação  $A_{260/280}$ , pelo micrométodo foi maior que o da precipitação salina ( $p=0,0164$ ), como podemos observar na Tabela I. Essas características revelam que a extração de DNA genômico, utilizando o método proposto, produz amostras de DNA de qualidade comparável a aquelas obtidas pela técnica de precipitação salina e adequadas para fins de amplificação de genes (Figuras 2-5). Os CV intra-ensaio apresentados na Tabela II são considerados aceitáveis na rotina laboratorial, segundo as normas dos programas de controle de qualidade<sup>27</sup>.

O estudo comparativo entre as concentrações de DNA obtidas por ambos os métodos de extração de DNA, utilizando o teste "t" de *Student*, demonstrou que as concentrações obtidas pelo micrométodo foram 1,5 vezes superiores às obtidas pelo método de precipitação salina. Essa diferença pode ser devida à perda de leucócitos durante a etapa de lavagem<sup>21</sup>, considerando que no método de precipitação salina, são necessárias várias lavagens para a remoção completa da hemoglobina<sup>23</sup>. Outra possível explicação para esse resultado é que no método de precipitação salina, a proporção amostra/reagente na etapa de lise é maior que a do micrométodo, o que pode dificultar a extração do DNA, reduzindo a sua recuperação. Entretanto, a concentração de DNA obtida pelo método de precipitação salina é suficiente para a realização de técnicas de triagem de alterações genéticas.

As amostras de DNA extraído pelo micrométodo mostraram-se adequadas para sua utilização nas técnicas de PCR-RFLP e PCR-SSCP, para a detecção e identificação de alterações genéticas associadas à HF e à FDB (Figuras 2-5).

Em resumo, o procedimento de extração de DNA proposto neste estudo, é simples, rápido e aplicável para obtenção de DNA genômico de alta qualidade

em 30 minutos, sendo portanto, útil no diagnóstico molecular da HF.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e o apoio da CELM - Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos. Luis A. Salazar é bolsista de doutoramento da FAPESP (Proc. 98/09759-8).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Beutler, E.; Gelbalt, T. and Kuhl, W. Interference of heparin with the polymerase chain reaction. *BioTechniques*, 9:166, 1990.
2. Berkmann, N.; Weir, B.; Pressman-Schwartz, S.; Reshef, A. and Leitersdorf, E. Haplotype analysis at the low density lipoprotein receptor locus: application to the study of familial hypercholesterolemia in Israel. *Hum. Genet.*, 88: 405-410, 1992.
3. Brown, MS. & Goldstein, JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, 232:34-47, 1986.
4. Cavalli, S.A.; Hirata, M.H. and Hirata, R.D.C. Rapid detection of 3500Q and 3531 mutations and *MspI* polymorphism in exon 26 at the apolipoprotein B gene. *J. Clin. Lab. Anal.*, 15:35-39, 2001.
5. Chaves, F.J.; Puig, O.; Garcia-Sogo, M.; Real, J.; Gil, J.V.; Ascaso, J.; Carmena, R. and Armegod, M.E. Seven DNA polymorphism in the LDL receptor gene: application to the study of familial hypercholesterolemia in Spain. *Clin. Genet.*, 50:28-35, 1996.
6. Everson, R.; Mass, M. and Gallager, J. Extraction of DNA from cryopreserved clotted human blood. *BioTechniques*, 15 (1):18-20, 1993.
7. Garg, U.; Hanson, N.; Tsai, M. and Eckfeldt, J. Simple and rapid method for extraction of DNA from fresh and cryopreserved clotted human blood. *Clin. Chem.*, 42 (4): 647-648, 1996.
8. Goldstein, J.; Hobbs, H. and Brown, M. Familial hypercholesterolemia. In: Scriver C.; Beaudet, A.; Sly, W.; Valle, D. eds. *The Metabolic bases of inherited disease*. New York: McGraw-Hill, 1981-2030, 1995.
9. Grimberg, J.; Nowoschik, S.; Belluscio, L.; McKee, R.; Turck, A. and Eisenberg, A. A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 17 (20): 8390, 1989.
10. Heath, K.; Gahan M.; Whittall R. and Humphries, S.E. Low-density lipoprotein receptor gene (LDLR) world-wide website in familial hypercholesterolemia: update, new features and mutation analysis. *Atherosclerosis*, 154:243-246, 2001.
11. Hobbs, H.; Brown, M. and Goldstein, J. Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation*, 1: 445-466, 1992.
12. Jeanpierre, M. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res.*, 15:9611, 1987.
13. Lahiri, D. and Nurnberger, J. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19 (19): 5444, 1991.
14. Loparev, V.; Cartas, M.; Monken, C.; Velpandi, A. and Srinivasan, A. An efficient and simple method of DNA extraction from whole blood and cell lines to identify infectious agents. *J. Virol. Methods*, 34: 105-112, 1991.
15. Miller, S.; Dykes, D. and Polesky, H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16 (3): 1215, 1988.
16. Myant, N.B. Familial defective apolipoprotein B-100: a review, including some comparisons with familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 104: 1-18, 1993.
17. Nissen, H.; Guldberg, P.; Hansen, P.; Petersen, N. and Horder, M. Clinically applicable mutation screening in familial hypercholesterolemia. *Hum. Mut.*, 8: 168-177, 1996.
18. Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. and Sekiya, T. Detection of polymorphisms of human DNA gel electrophoresis as single strand conformational polymorphisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 86: 2766-2770, 1989.
19. Planelles, D.; Llopis, F.; Puig, N. and Montoro, J. A new, fast, and simple DNA extraction method for HLA and VNTR Genotyping by PCR amplification. *J. Clin. Lab. Anal.*, 10: 125-128, 1996.
20. Puig, O.; Chaves, F.J.; Garcia-Sogo, M.; Real, J.; Gil, J.V.; Ascaso, J. and Armegod, M.E. A three-allelic polymorphic system in exon 12 of the LDL receptor gene is highly informative for segregation analysis of familial hypercholesterolemia in the Spanish population. *Clin. Genet.*, 50:50-53, 1996.
21. Ros, K.; Haites, N. and Kelly K. Repeated freezing and thawing of peripheral blood and DNA in suspension: effects on DNA yield and integrity. *J. Med. Genet.*, 27: 569-570, 1990.
22. Rubinsztein, D.; Coetzee, G.; Marias, A.; Leitersdorf, E.; Seftel, H. and van der Westhuyzen D. Identification and properties of the proline 664-leucine mutant LDL receptor in South Africans of Indian origin. *J. Lipid Res.*, 33: 1647-1655, 1992.
23. Salazar, L.; Hirata, M.; Cavalli, S.; Machado, M. and Hirata, R. Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin. Chem.*, 44 (8): 1748-1750, 1998.
24. Sambrook, J.; Fritsch, E. and Maniatis, T. Commonly used techniques in molecular cloning. In: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
25. Tai, S.; Koay, E.; Chan, E.; Seng, T.; Loh, L.; Sethi, S. and Tan, C. Compound heterozygous Familial Hypercholesterolemia and Familial Defective Apolipoprotein B-100 produce exaggerated hypercholesterolemia. *Clin. Chem.*, 47(3):438-443, 2001.
26. Tas, S. Purification of DNA from clotted blood. *Clin. Chem.* 36 (10): 1851, 1990.
27. Tiburcio, H. *Controle Interno da Qualidade Analítica*. 1ª ed. Editora da Soc. Bras. Anál. Clín., Rio de Janeiro, RJ, 1995.
28. Williams, R.; Hunt, S.; Schumacher, C.; Hegele, R.; Leppert, M.; Ludwig, E. and Hopkins, P. Diagnosing heterozygous Familial Hypercholesterolemia using new practical criteria validated by molecular genetics. *A. J. Cardiol.*, 72:171-176, 1993.
29. World Health Organization Report on Familial Hypercholesterolemia. Report of a Second WHO Consultation: WHO/HGN/FH/CONS/99.2. [Geneva, 4 September 1998].
30. Yokota, M.; Tatsumi, N.; Nathalang, O.; Yamada, T. and Tsuda, I. Effects of Heparin on polymerase chain reaction for blood white cells. *J. Clin. Lab. Anal.*, 13: 133-140, 1999.
31. Yokota, M.; Tsuda, I. and Tatsumi, N. Availability of Nagarse for DNA analysis as a substitute for Proteinase K. *J. Clin. Lab. Anal.*, 14: 97-100, 2000.

Endereço para correspondência

Prof. Luis Antonio Salazar

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

Av. Prof. Lineu Prestes 580, Bloco 17, CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil

Fax: (0XX11) 3813-2197; E-mail: luisn@usp.br

## Credenciamento do Sistema da Qualidade

A SBAC vem realizando um curso preparatório para o laboratório implantar um Sistema da Qualidade, com ou sem o objetivo de alcançar o credenciamento.

Assim como todos os organismos de certificação que fornecem treinamento para os interessados no reconhecimento de um Sistema da Qualidade, a SBAC atuará dentro desse mesmo princípio e objetivo: treinar os interessados, para alcançarem o credenciamento pela SBAC.

### Informações

### Sociedade Brasileira de Análises Clínicas

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

Tel.: (0xx21) 2264-4449/2234-4881

e-mail: credenciamento@sbac.org.br

# HPV na gênese de lesões cérvico-uterinas - Métodos diagnósticos (Citopatologia - Tipagem viral)\*

## HPV in the genesis os cervico uterine lesions - Methods diagnosis (Cytopathological - Viral type)

Marcia Elena Zamin Bringhenti<sup>1</sup>, Thissiane de Lima Gonçalves<sup>2</sup> & Yarema Bedin Rodrigues<sup>2</sup>

**RESUMO** – Demonstrou-se a importância que o *Papillomavirus* humano (HPV) desempenha na gênese das lesões genitais, considerando sua participação na etiologia do câncer cervical. Métodos diagnósticos da infecção por HPV incluem métodos citológicos, histológicos, também a coloscopia e métodos moleculares. Neste trabalho foram avaliados 3.000 exames citopatológicos (*Papanicolaou*) de pacientes do Laboratório Vital, no período de 01/1999 a 04/2000. Em relação aos resultados dos exames citopatológicos, 1,66% das pacientes foram classificadas como LSIL (Lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau), 0,53% como HSIL (Lesão escamosa intra-epitelial de alto grau), 0,06% como carcinoma e 0,46% como ASCUS e AGUS (atipias escamosas e glandulares de significado indeterminado), sendo que a idade média para LSIL foi de 20,3 anos e HSIL de 40,1 anos. Considerando a associação com HPV, obteve-se 1,63% de casos de LSIL e HSIL com HPV, com idade média de 26,8 anos para LSIL com HPV e 33,1 anos para HSIL com HPV. Das pacientes com diagnóstico compatível com HPV realizou-se o exame de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) de 14 pacientes que colaboraram no presente trabalho, destas 6 apresentaram PCR positiva para HPV, sendo 3 pacientes HPV tipo 11, 1 HPV 16, 1 HPV 18 e 1 HPV 6B. Destas pacientes foram considerados os fatores de risco associados ao HPV para o desenvolvimento de câncer cervical, os resultados dos exames citopatológicos e de PCR com respectiva tipagem viral e interpretação quanto ao potencial oncogênico do HPV.

**PALAVRAS-CHAVE** – HPV, exame citopatológico, PCR, tipagem viral, potencial oncogênico.

**SUMMARY** – The importance that the human Papillomavirus (HPV) carries out in the genesis of the genital lesions was demonstrated, considering its participation in the etiology of the cervical cancer. Diagnoses methods of the infection by HPV include cytological, histological, and molecular methods, as well as colposcopy. In this work, 3.000 cytopathological exams (*Papanicolaou*) of patients of the Vital Laboratory were appraised, during the period of January, 1999 to April, 2000. In relation to the results of the cytopathological exams, 1.66% of the patients were classified as LSIL (lesion scaly intraepithelial of low degree), 0.53% as HSIL (lesion scaly intraepithelial of high degree), 0.06% as carcinoma and 0.46% as ASCUS and AGUS (scaly and glandular atypias of uncertain meaning), and the average age for LSIL was of 20.3 years and HSIL 40.1 years old. Considering the association with HPV, 1.63% of cases of LSIL and HSIL were obtained, with average age of 26.8 years old for LSIL with HPV and 33.1 years old for HSIL with HPV. 14 patients with compatible diagnosis with HPV took the exam of PCR (*Polymerase Chain Reaction*), which contributed with this work, 6 of them presented PCR positive for HPV, being 3 patients HPV tipe 11, 1 HPV 16, 1 HPV 18 and 1 HPV 6B. For these patients the risk associated factors with HPV were considered for the development of cervical cancer, and also the results of the cytopathological exams and of PCR with respective viral type verification and interpretation with relation to the carcinogenic potential of HPV.

**KEYWORDS** – HPV, cytopathological exam, PCR, viral type verification, carcinogenic potential.

### INTRODUÇÃO

O grupo de *Papillomavirus* humano (HPV) compreende mais de 20 tipos de vírus relacionados à infecção genital. Os tipos 16, 18, 45, 56 estão frequentemente associados com displasias e carcinoma cervical e são considerados de alto risco, os tipos 31, 33, 35, 51, 52, 58 de risco intermediário e os tipos 6, 11, 40, 42 e 44 de baixo risco<sup>7,9</sup>. O diagnóstico precoce pelo exa-

me de *Papanicolaou* tem sido muito útil e usado em todo o mundo, com bastante sucesso no rastreamento do câncer uterino. A detecção e a tipagem do papilomavirus são importantes na prevenção e tratamento das lesões que podem evoluir para carcinomas cervicais<sup>3,11</sup>.

Devido ao risco relativo de câncer associado com certos tipos de HPVs (oncogênicos), tem sido sugerida uma detecção da infecção viral direcionada aos tipos de HPV de alto risco, para complementar o exame

Recebido em 9/8/2001  
Aprovado em 10/8/2001

\*Prêmio CFF – XV Congresso Latinoamericano de Bioquímica Clínica e XXVIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas - 2001 - Florianópolis, SC

<sup>1</sup>Trabalho de Monografia de conclusão de curso de Especialização em Análises Clínicas e Toxicológicas da UFSM

<sup>2</sup>Farmacêutica-bioquímica, acadêmica do curso de Especialização em Análises Clínicas da UFSM

<sup>2</sup>Professora de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da UFSM

**TABELA I**  
Distribuição dos achados citológicos segundo a classificação de Bethesda

Resultados	Nº de pacientes	%
NPCN	2.909	96,99%
LSIL	50	1,66%
HSIL	16	0,53%
Carcinoma	2	0,06%
ASCUS/AGUS	14	0,46%
Inadequado	9	0,30%
<b>Total</b>	<b>3.000</b>	<b>100,00%</b>

NPCN: Negativo para células neoplásicas

**TABELA III**  
Distribuição dos exames citopatológicos compatíveis com HPV

Resultados	Nº de pacientes	%
Citologia inflam. com HPV (LSIL)	15	0,50%
NIC I c/ HPV (LSIL)	28	0,93%
NIC II c/ HPV (HSIL)	6	0,20%
<b>Total</b>	<b>49</b>	<b>1,63%</b>

de Papanicolaou na detecção de mulheres com risco para o desenvolvimento de câncer cervical<sup>5,10</sup>.

Vários estudos têm sido realizados no sentido de determinar a tipagem viral. Um método que vem sendo amplamente utilizado para a identificação e tipagem do vírus HPV é a reação em cadeia de polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*). Trata-se de uma técnica de alta sensibilidade e potencialidade de automação<sup>7,12</sup>.

No presente trabalho buscamos avaliar nos exames citopatológicos realizados no Laboratório Vital de Nonoai as alterações causadas pelo HPV. Naqueles onde se constatou tais alterações realizou-se a pesquisa do DNA-HPV, através da PCR. Também pela PCR se avaliou o potencial oncogênico nas LSIL (Lesões intra-epiteliais cervicais de baixo grau), HSIL (Lesões intra-epiteliais cervicais de alto grau) e ASCUS (células escamosas atípicas de significado indeterminado) a fim de contribuir com o clínico para a conduta terapêutica e seguimento das pacientes.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados 3.000 exames citopatológicos no período de 01/1999 a 04/2000 realizados no Laborató-

**TABELA II**  
Distribuição dos diagnósticos citológicos de LSIL e HSIL conforme a faixa etária

Resultado	Idade média
LSIL	20,3 anos
HSIL	40,1 anos

**TABELA IV**  
Distribuição dos resultados citológicos compatíveis com HPV em relação com faixa etária

Resultado	Idade média
Citologia Inflam. c/ HPV NIC I c/ HPV	LSIL 26,8
NIC II c/ HPV	HSIL 33,1

**TABELA V**  
Resultados dos exames de PCR com respectiva tipagem viral e interpretação quanto ao potencial oncogênico do HPV

Resultado dos exames citopatológicos	Nº de pacientes	Resultados dos exames de PCR				
		HPV 6B Baixo risco	HPV 11 Baixo risco	HPV 16 Alto risco	HPV 18 Alto risco	Negativo
LSIL com HPV	10	1	3	1	-	5
HSIL com HPV	2	-	-	-	1	1
ASCUS	2	-	-	-	-	2
<b>TOTAL</b>	<b>14</b>	<b>1</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>8</b>

rio Vital – Análises Clínicas e Citopatologia da cidade de Nonoai. Os exames foram coletados de FSV (fundo de saco vaginal), ectocérvice e endocérvice e corados pela técnica de Papanicolaou.

Após a triagem pelo exame citopatológico, 14 pacientes com LSIL, HSIL e ASCUS associados ao HPV, foram selecionadas para o exame de PCR. O número de pacientes que colaboraram neste estudo não corresponde ao percentual de diagnósticos de HPV pela citologia (1,63%, 49 pacientes) pois muitas pacientes não foram localizadas ou já haviam iniciado tratamento prévio. O exame de PCR foi realizado no laboratório de biologia molecular – Simbios Biotecnologia, de Porto Alegre. Foi realizada coleta de material endocervical, ectocervical e de lesões visíveis colposcopicamente ou macroscópicas com escova apropriada, colocados em solução tampão adequada, mantidos congelados e encaminhados ao laboratório. Para a reação de PCR o DNA-HPV foi extraído e amplificado com *primers* (MY09 e MY11) para a beta-globina humana e HPV genérico. As amostras positivas foram analisadas quanto a determinação dos tipos virais.

Na análise dos exames citopatológicos foram observadas as seguintes variáveis: distribuição dos achados citológicos segundo a Classificação Internacional

de Bethesda, distribuição das LSIL e HSIL conforme a faixa etária, distribuição dos exames citopatológicos compatíveis com HPV e faixa etária predominante.

Na análise dos exames por PCR foram considerados os fatores de risco associados ao HPV na evolução do câncer cervical: Uso de ACO (anticoncepcional oral), tabagismo e número de parceiros sexuais.

## RESULTADOS

Os resultados dos 3.000 exames citopatológicos avaliados serão descritos a seguir.

Conforme a classificação de Bethesda 2.909 pacientes (96,99%) apresentaram resultado NPCN (negativo para células neoplásicas, compreendendo as alterações celulares benignas), 50 pacientes (1,66%) com LSIL, 16 pacientes (0,53%) com HSIL, 2 pacientes com carcinoma (0,06%), 14 pacientes (0,46%) com ASCUS e AGUS e 9 pacientes (0,30%) com resultado inadequado para avaliação citológica (Tab. I).

De acordo com a faixa etária, a idade média para as LSIL foi de 20,3 anos e para as HSIL foi de 40,1 anos (Tab. II).

Dos 3.000 exames citopatológicos analisados, 49 (1,63%) foram compatíveis com HPV, sendo 15 casos (0,50%) de citologia inflamatória com HPV, 28 casos (0,93%) de NIC I com HPV (LSIL) e 6 (0,20%) casos de NIC II com HPV (HSIL) (Tab. III).

Em relação à faixa etária obteve-se a idade média de 26,8 anos para LSIL com HPV e de 33,1 anos para HSIL com HPV (Tab. IV).

Em relação aos resultados dos exames de PCR, houve amplificação do DNA-HPV para os casos com LSIL com HPV (10 pacientes), 1 paciente com HPV 6B (baixo risco oncogênico), 3 pacientes com HPV 11 (baixo risco oncogênico) e 1 paciente com HPV 16 (alto risco oncogênico), para os casos de HSIL com HPV (2 pacientes) 1 paciente com HPV 18 (alto risco oncogênico) e para os casos de ASCUS (2 pacientes) as duas amostras tiveram resultado negativo (Tab. V).

## DISCUSSÃO

Através do levantamento dos resultados dos exames citopatológicos pode-se constatar que houve um grande predomínio de exames com resultado negativo para células neoplásicas, dentre estes estão incluídos os resultados com citologia inflamatória, alterações celulares benignas, com um índice relativamente pequeno de casos de neoplasia intra-epitelial cervical de baixo grau (LSIL) e alto grau (HSIL), conforme Tabela 1, que comprova a eficácia do exame citopatológico como exame preventivo, pois a realização periódica do exame de *Papanicolaou* é o primeiro passo rumo à prevenção do câncer do colo uterino<sup>2</sup>.

Em relação à faixa etária das pacientes com LSIL e HSIL (Tabela 2) houve maior incidência em pacientes jovens. Segundo Souen & Pinotti<sup>18</sup> as lesões precursoras de neoplasia cervical afetam mulheres com idade média de 35 anos e os carcinomas invasores com idade média de 47,8 anos. Esta incidência se deve princi-

palmente aos programas de rastreamento, onde se detecta lesões precursoras principalmente em pacientes jovens, com início precoce da atividade sexual e a associação com o vírus HPV.

Considerando os exames compatíveis com HPV conforme Tabela III, diversos autores demonstram ter aumentado a incidência de neoplasias intra-epiteliais cervicais associadas ao HPV na última década, com variações de 0,7% a 10% nas diferentes populações, considerando comportamentos sexuais distintos nos vários grupos populacionais. Na população em geral, a prevalência da infecção cérvico-vaginal pelo HPV está entre 0,5% a 2,5%, com múltiplas variações regionais<sup>4</sup>.

A presença do HPV no levantamento apresentado ocorreu preferencialmente em pacientes jovens (Tabela IV) estando em concordância com a prevalência do HPV na população em geral, conforme referem Morrison *et al.*<sup>13</sup> e Schiffman<sup>15,16</sup>. De acordo com Dores<sup>4</sup>, a infecção por HPV pode ocorrer em qualquer faixa etária, sendo que a maior incidência ocorre entre 20 e 29 anos (70,9%), pois esta é uma doença que afeta a mulher jovem, em plena vida reprodutiva e na fase de maior atividade sexual. Também Jacyntho & Barcelos<sup>8</sup> e Sedlacek<sup>17</sup> referem que as chances de mulheres mais jovens adquirirem infecção por HPV se devem também aos fatores de risco associados, tais como: início precoce das relações sexuais, tabagismo, maior número de parceiros, pois atualmente a infecção por HPV é considerada uma doença sexualmente transmissível.

Devido ao risco relativo de câncer cervical associado com certos tipos de HPVs, foi realizada a detecção e tipagem viral pela técnica de PCR. Também foram considerados os fatores de risco associados.

Em relação ao número de parceiros sexuais, a maioria das pacientes já tiveram mais de dois parceiros sexuais, predominando pacientes jovens com idade inferior a 30 anos e fazendo uso de anticoncepcional oral. Estes dados são semelhantes aos encontrados por Zetler *et al.*<sup>22</sup> e Redecha<sup>14</sup>.

Também Dores<sup>4</sup> refere que o risco relativo aumenta proporcionalmente com o aumento do número de parceiros sexuais, se assemelhando às outras doenças sexualmente transmissíveis.

Considerando os resultados dos exames pela PCR (Tabela 5) devido ao pequeno número de pacientes avaliadas, cada caso necessita de uma avaliação distinta, porém não houve concordância com a literatura devido ao grande número de pacientes com resultado negativo, onde não houve amplificação do DNA-HPV após PCR. Na literatura o exame PCR é considerado mais sensível, sendo superior às demais técnicas de diagnóstico, sendo usada para casos de falso-negativo na citologia, conforme referem Walboomers<sup>20,21</sup> e Trofatter<sup>19</sup> Também conforme Fonseca *et al.*<sup>5</sup> e Ikuta *et al.*<sup>7</sup>, ficou bem estabelecida a maior sensibilidade do PCR pela ocorrência de positividade em situações onde outros métodos apresentam resultado negativo.

Apesar do restrito número de casos em que foram realizados PCR, a discordância entre os métodos diagnósticos poderia ser justificada pelo período de tempo

entre a realização dos exames, onde este poderia ser suficiente para uma pronta resposta imunológica, visto que a remissão espontânea é observada em aproximadamente 30 % dos casos de condiloma, pois o comportamento biológico das lesões HPV induzidas é pleomórfico. A escolha inadequada do local de coleta ou a possibilidade de ser infecção recente, de tal modo que o agente etiológico tenha comprometido um pequeno número de células também poderão resultar em falso negativo<sup>4</sup>.

Conforme Frederickson *et al.*<sup>6</sup> a utilidade dos diferentes métodos diagnósticos dependem do curso da doença em que são utilizados, usando PCR com *primers* MY09 e MY11 em pacientes com possível infecção por HPV e displasia cervical, 78% tiveram DNA-HPV identificado.

Qualquer que seja o método molecular empregado, é necessário admitir que a ausência de HPV em determinada lesão pode corresponder as seguintes possibilidades: a ausência real de DNA virótico dentro da lesão, a existência de outro tipo de HPV não pesquisado pela técnica utilizada ou ao pequeno número de cópias do vírus no espécime analisado<sup>1</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Almeida Filho, G. L. *Infecção cervical induzida pelo HPV: o lugar da hibridização molecular*. Instituto de Ginecologia da UFRJ, Rio de Janeiro, p.14-15, nov. 1997.
2. Congresso Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia, 48., 1999, Goiânia, Anais. Goiânia, 1999.
3. Coordenação Nacional de DST/AIDS. *Manual de controle das doenças sexualmente transmissíveis*. [online] 3.ed. 1999. Disponível na Internet via WWW. URL.: <http://www.aids.gov.br/dst.htm>
4. Dore, G. B. *HPV na genitália feminina: manual e guia prático de cirurgia de alta frequência*. São Paulo: Multigraf Ed., 1994. 109p.
5. Fonseca, A. S. K., Lunge, V. R., Ikuta, N. Detecção e tipagem molecular de papilomavírus humano (HPV) em amostras de cérvix uterino. Laes & Haes, n.114, p.148-154, 1998.
6. Frederiksson, A., Larson, B., Persson, E. *et al.* HPV-types, cytological and histopathological findings in three groups of women with possible HPV-related disease. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, v.75, n.6, p.556-562, July, 1996.

7. Ikuta, N., Nonnenmacher, B., Villa, L. L. *et al.* Detecção e tipagem molecular de Papilomavírus Humano (HPV) em 460 amostras de colo uterino: estudo comparativo com exames citopatológico e colposcópico. *RBAC*, v. 39, n.2, p.203-204, 1997.
8. Jacyntho, C., Barcellos, C. Infecção pelo HPV e lesões pré-neoplásicas genitais. Investigação laboratorial e conduta. *Femina*, v.27, n.9, p.681-686, out. 1999.
9. Jacyntho, C. Almeida Filho, G., Maldonado, P. HPV infecção genital feminina e masculina. Rio de Janeiro: *Revinter*, 1994.
10. Liaw, K. L., Glass, A. G., Manos, M. M. *et al.* Detection of human papillomavirus DNA in cytologically normal women and subsequent cervical squamous intraepithelial lesions. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.91, n.11, p.954-960, 1999.
11. Maldonado, P., Christó Junior, W. G., Arantes Junior, J. C. Conduta nas infecções cérvico-vaginais pelo papiloma vírus. *Femina*, v.22, n.4, p.229-233, abr.1994.
12. Manos, M. M., Ting, Y., Wright, D. K. *et al.* Use of polymerase chain reaction amplification for the detection of genital human papillomavirus. *Molecular Diagnostics of Human Cancer*, p.209-214, 1989.
13. Morrison, E. A. B., H. O., G. Y. F., Vermund, S. H. *et al.* Human papillomavirus infection and other risk factors for cervical neoplasia: a case-control study. *Int. J. Cancer*, v.49, p.6-13, 1991.
14. Redecha, M., Korbelt, M., Borovsky, M., Ferancikova, Z. Papillomavirus infection of the uterine cervix in women using contraception. *Ceska Gyne-col.*, v.64, n.2, p.90-95, 1999.
15. Schiffman, M. H., Bauer, H. M., Hoover, R. N. *et al.* Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.85, n.12, p.958-964, 1993.
16. Schiffman, M. H. Recent progress in defining the epidemiology of human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *J. Natl. Cancer Inst.*, v.84, n.6, p.394-398, 1992.
17. Sedlacek, T. V. Advances in the diagnosis and treatment of human papillomavirus infections. *Clin. Obstet. Gynecol.*, v.42, n.2, p.206-220, 1999.
18. Souen, J. S., Pinotti, J. A. *Manual – câncer genital feminino*. São Paulo: Roca, 1992, 138p.
19. Trofatter, K. F. Diagnosis of human papillomavirus genital tract infection. *Am. J. Med.*, v.102, n.5 A, p.21-27, May, 1997.
20. Walboomers, J. M., Husman, A. M., Snijders, P. J. *et al.* Human papillomavirus in false negative archival cervical smears: implications for screening for cervical cancer. *J. Clin Pathol.*, v.48, n.8, p.728-732, 1995.
21. Walboomers, J. M., Jacobs, M. V., Manos, M. M. *et al.* Human Papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J. Pathol.* v.189, p.12-19, 1999.
22. Zettler, G. G., Zordan, R. A., Maus, K. P. *et al.* A relação do Papiloma vírus humano com as neoplasias intra-epiteliais cervicais do colo do útero. *R. AMRIGS*, Porto Alegre, v.36, n.2, p.71-75, abr./jun., 1992.

Endereço para correspondência:

Dr<sup>a</sup> Marcia E. Z. Bringhenti  
Rua Borges de Medeiros, 963 - CP 36 - Nonoai - RS - 99.600-000  
Fone/Fax (0xx54)362-1151  
E-mail: vital@pro.via-rs.com.br

## TEMAS LIVRES

### Prêmio DOLES

Categoria: "Melhor trabalho em Bioquímica"

Valor equivalente a 20 salários mínimos

Será concedido um prêmio aos trabalhos apresentados e selecionados na sessão de Temas Livres dos congressos promovidos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

A premiação será feita na sessão de abertura, com a entrega do diploma.

O trabalho vencedor desse prêmio poderá fazer parte da programação oficial do Congresso.

Para concorrer ao prêmio, os interessados devem solicitar as informações necessárias à

**Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**

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

Tel (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2234-4881

e-mail: [informacao.cong@sbac.org.br](mailto:informacao.cong@sbac.org.br)

# Glicemia em jejum como critério diagnóstico para o *Diabetes mellitus* correlacionada com o perfil lipídico\*

## Fasting glycemia as *diabetes mellitus* diagnostic criterion and the correlation with the lipid profile

Magda P. P. Nascimento<sup>1</sup>; Marileia Scartezini<sup>2</sup>; Vânia M. Alcântara<sup>2</sup>; Cyntia M. T. Fadel-Picheth<sup>2</sup> & Geraldo Picheth<sup>2</sup>

**RESUMO** – Patologias como o *diabetes mellitus* que alteram o metabolismo da glicose também interferem com o metabolismo lipídico. Foram selecionados ao acaso 1000 pacientes, os quais foram classificados pela glicemia em jejum em 4 grupos: G-1 (60 – 110 mg/dL), G-2 (111 – 125 mg/dL); G-3 (126 – 139 mg/dL), and G-4 ( $\geq 140$  mg/dL). A glicemia e o perfil lipídico foram medidos utilizando reagentes enzimáticos (Labtest) em sistema automatizado (Selectra II / Bayer). A comparação entre os grupos foi realizada através de análise de variância (Anova/Manova). Os dados da análise mostraram: 1) o grupo normoglicêmico (G-1) apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,001$ ) para colesterol total, HDL-C e triglicérides em relação aos demais grupos, 2) não houve diferença significativa nos níveis de LDL-C ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados; 3) os níveis de colesterol total e triglicérides foram significativamente diferentes ( $p = 0,042$  e  $p = 0,015$ , respectivamente) nos grupos G-3 e G-4. Os dados sugerem que a redução nos valores de discriminação para o *diabetes mellitus* preconizados pela Associação Americana de Diabetes ( $\geq 126$  mg/dL) permitem a detecção de indivíduos diabéticos com níveis menores de colesterol total e triglicérides quando comparados com o critério anterior, recomendado pela Organização Mundial da Saúde ( $\geq 140$  mg/dL).

**PALAVRAS-CHAVE** – *Diabetes mellitus*, perfil lipídico, estudo de correlação.

**SUMMARY** – Pathologies like *diabetes mellitus* that alter glucose metabolism also interfere with lipid metabolism. Randomly selected, 1000 patients, were classified by fasting plasma glucose in 4 groups: G-1 (60 – 110 mg/dL), G-2 (111 – 125 mg/dL); G-3 (126 – 139 mg/dL), and G-4 ( $\geq 140$  mg/dL). The serum glucose and lipid profile was performed using enzymatic reagents (Labtest) in an automated system (Selectra II / Bayer). The group comparisons were performed with variance analyses (Anova/Manova). The data analyses showed that: 1) the normoglycemic (G-1) showed significant lower differences ( $p < 0.001$ ) in the total cholesterol, HDL-C and triglycerides; 2) the LDL-C didn't show any significant differences ( $p < 0.05$ ) among the studied groups; 3) serum levels of total cholesterol and triglycerides showed themselves to be significant lower differences between groups G-3 and G-4 ( $p = 0.042$  and  $p = 0.015$ , respectively). The data suggests that the reduction of the cut off for the *Diabetes mellitus* diagnosis from the American Diabetes Association Criterion ( $\geq 126$ mg/dL) enables detection of Diabetic individuals with lower levels of total cholesterol and triglycerides when compared to the former recommended criterion from the World Health Organization ( $\geq 140$ mg/dL).

**KEYWORDS** – *Diabetes mellitus*, lipid profile, correlation study.

## INTRODUÇÃO

O *Diabetes mellitus* é caracterizado por hiperglicemia resultante de defeitos de secreção e/ou ação da insulina<sup>6,19</sup>.

O diagnóstico laboratorial do paciente com diabetes é realizado pela quantificação dos níveis glicêmicos em jejum ou após uma sobrecarga de glicose, também designada curva glicêmica<sup>12,15</sup>. A glicemia em jejum como parâmetro diagnóstico para diabetes sofreu uma alteração nos valores de discriminação, cujo novo critério ( $\geq 126$  mg/dL em mais de uma ocasião) é refe-

rendado entre outros pela Associação Americana de Diabetes. Este novo limite é inferior ao anteriormente estabelecido ( $\geq 140$  mg/dL em mais de uma ocasião) referendado na época pela Organização Mundial da Saúde. Os novos critérios introduziram um perfil designado "intolerância parcial à glicose em jejum", quando os níveis glicêmicos oscilam repetidamente entre  $> 110$  e  $< 126$  mg/dL<sup>16</sup>. A Figura 1 e a Tabela I representam estes valores.

O novo valor para discriminação, de 126 mg/dL para glicemia de jejum, foi escolhido baseado em estudos que compararam a glicose de jejum e a glicose duas horas

Recebido em 2/5/2001  
Aprovado em 10/8/2001

\*Prêmio DOLES – XV Congresso Latinoamericano de Bioquímica Clínica e XXVIII Congresso Brasileiro de Análises Clínicas – 2001 – Florianópolis, SC

<sup>1</sup>Farmacêutica-Bioquímica – Pós-Graduação – PUC-PR; <sup>2</sup>Professores – Depto de Patologia Médica – Universidade Federal do Paraná

Trabalho realizado no curso de Pós-Graduação – Especialização em Análises Clínicas com ênfase na interdisciplinaridade da Pontifícia Univ. Católica do Paraná

**TABELA I**  
**Critérios diagnósticos para o *Diabetes mellitus*<sup>16</sup>**

Classe	Qualquer um dos seguintes achados	Critérios diagnósticos	
		Novos	Antigos
Tipo 1	Sintomas clássicos e glicemia casual	≥ 200 mg/dL	≥ 200 mg/dL
Tipo 2	Glicemia em jejum	≥ 126 mg/dL	≥ 140 mg/dL
Outros tipos específicos	TOTG (75g) no tempo 120 minutos Confirmar com outra determinação em dia subsequente	≥ 200 mg/dL	≥ 200 mg/dL

TOTG = Teste Oral de Tolerância à Glicose ou curva glicêmica

pós-sobrecarga relacionando-as com as complicações micro e macrovasculares, em especial a retinopatia<sup>2,7,21</sup>.

A gravidade e precocidade das complicações cardiovasculares, particularmente das artérias coronárias, são significativamente aumentadas nos pacientes diabéticos<sup>9</sup>. O *Diabetes mellitus* representa um fator de risco cardiovascular independente e a macroangiopatia é responsável por 80% da mortalidade na população diabética<sup>3,4,13</sup>.

Alterações no metabolismo da glicose, como os provocados nos pacientes com diabetes levam a alterações no metabolismo dos lípidos<sup>5</sup>.

A aterosclerose é a mais freqüente causa de morte prematura nesse grupo de pacientes, duplicando o risco de doença coronária, triplicando o de acidente vascular cerebral e quadruplicando a possibilidade de ocorrência de insuficiência vascular periférica sintomática. A associação entre doença aterosclerótica e *Diabetes mellitus* pode ser atribuída a uma série de características, que facilitam a aterogênese nesse grupo de pacientes, como a concomitância de outros fatores de risco, dos quais a obesidade, hipertensão arterial sistêmica, os níveis mais elevados de fibrinogênio e as dislipidemias são os mais importantes<sup>11</sup>.

Uma relação entre o diagnóstico de *Diabetes mellitus* e alterações no perfil lipídico é muito freqüente, em especial com os níveis de triglicérides<sup>20</sup>.

Avaliar o comportamento do perfil lipídico quando pacientes são separados pela glicemia de jejum e agrupados pelos critérios da Associação Americana de Diabetes (novos critérios) e pelos critérios da Organização Mundial da Saúde (critérios antigos) é o objetivo deste trabalho.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Amostra

Os dados foram obtidos da base informatizada do Laboratório de Análises Clínicas São Camilo – Maringá - Norte do Paraná. As amostras foram coletadas em jejum com mínimo de 12 horas, sendo que a glicemia foi realizada em plasma EDTA-fluoretado e os demais ensaios coletado soro obtido em tubos de vácuo com gel separador (Vacutainer). Foi selecionada para o estudo, uma amostra de 1000 pacientes (de modo randômico), com idade variando de 13 a 92 anos (média de 57,6) composta de 52,8% de mulheres.

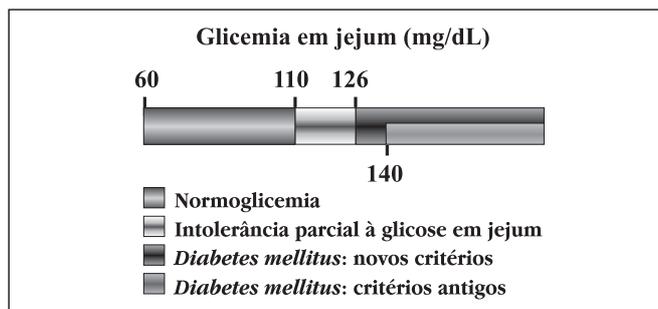


Figura 1. Caracterização da glicemia em jejum como critério diagnóstico para o *Diabetes mellitus*

### Classificação das amostras

As amostras foram classificadas em grupos de 1 a 4 segundo a glicemia em jejum, sendo o grupo 1 (G-1) composto por pacientes que apresentaram glicemia de jejum dentro dos valores de referência, 60 – 110 mg/dL; o grupo 2 (G-2) pacientes com glicemia de jejum classificados inicialmente como apresentando intolerância parcial à glicose em jejum; 111 – 125 mg/dL; o grupo 3 (G-3) pacientes apresentando glicemia entre 126 e 139 mg/dL e o grupo 4 (G-4) composto por pacientes apresentando glicemia em jejum superior ou igual a 140 mg/dL caracterizando possível diabetes pelo critério da Organização Mundial da Saúde (OMS).

### Métodos de dosagens

As determinações de glicose, colesterol total, HDL-colesterol (HDL-C) e triglicérides foram realizadas por métodos enzimáticos colorimétricos (Trinder) em analisador automatizado Vitalab Selectra II (Bayer) com reagentes da Labtest Diagnóstica Ltda. O LDL-colesterol (LDL-C) foi estimado pela equação de Friedewald (LDL-C = colesterol total – HDL-C - triglicérides/5), para triglicérides com valores menores que 400 mg/dL<sup>11,17</sup>.

### Análises estatísticas

As análises de variância (Anova/Manova) e demais estudos estatísticos foram realizadas com programa Statistica para Windows<sup>22</sup> versão 5.0.

## RESULTADOS

A distribuição e análise de variância das determinações de glicose encontra-se na Tabela II e Figura 2 caracterizando a classificação dos grupos.

Os resultados das análises de variância (Anova/Manova) com o perfil lipídico (colesterol total, HDL-C, LDL-C e triglicérides) encontram-se nas Tabelas III a VI e nas Figuras 3 a 6.

## DISCUSSÃO

A gravidade, precocidade e freqüência das complicações cardiovasculares, particularmente das artérias coronárias, são significativamente aumentadas nos pacientes com diabetes<sup>10,14</sup>. O *Diabetes mellitus* repre-

**TABELA II**

Análise de variância para determinação de glicose, para amostra classificada em grupos de 1 a 4 (G1 a G4) pela glicemia em jejum. Estão representados os valores de probabilidade e as médias ( $\pm$  desvio-padrão). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$

Glicose [grupos]	G-1 [92,9 $\pm$ 8,0]	G-2 [115,3 $\pm$ 4,3]	G-3 [131,1 $\pm$ 3,9]	G-4 [207,9 $\pm$ 65,5]
G-1 (60 - 110)	—	0,007	< 0,001	< 0,001
G-2 (111 - 125)	0,007	—	0,083	< 0,001
G-3 (126 - 139)	< 0,001	0,083	—	< 0,001
G-4 ( $\geq$ 140)	< 0,001	< 0,001	< 0,001	—

**TABELA III**

Análise de variância para colesterol total, para amostra classificada em grupos de 1 a 4 (G1 a G4) pela glicemia em jejum. Estão representados os valores de probabilidade e as médias ( $\pm$  desvio-padrão). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$

Colesterol [grupos]	G-1 [203,1 $\pm$ 40,4]	G-2 [209,3 $\pm$ 46,4]	G-3 [203,2 $\pm$ 45,9]	G-4 [214,9 $\pm$ 47,8]
G-1 (60 - 110)	—	0,541	0,970	0,0014
G-2 (111 - 125)	0,541	—	0,586	0,587
G-3 (126 - 139)	0,970	0,586	—	0,042
G-4 ( $\geq$ 140)	0,0014	0,587	0,042	—

**TABELA IV**

Análise de variância para HDL-C, para amostra classificada em grupos de 1 a 4 (G1 a G4) pela glicemia em jejum. Estão representados os valores de probabilidade e as médias ( $\pm$  desvio padrão). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$

HDL-C [grupos]	G-1 [43,7 $\pm$ 10,6]	G-2 [41,1 $\pm$ 8,6]	G-3 [39,4 $\pm$ 10,1]	G-4 [37,6 $\pm$ 13,6]
G-1 (60 - 110)	—	0,257	< 0,001	< 0,001
G-2 (111 - 125)	0,257	—	0,513	0,149
G-3 (126 - 139)	< 0,001	0,513	—	0,177
G-4 ( $\geq$ 140)	< 0,001	0,149	0,177	—

**TABELA V**

Análise de variância para LDL-C, para amostra classificada em grupos de 1 a 4 (G1 a G4) pela glicemia em jejum. Estão representados os valores de probabilidade e as médias ( $\pm$  desvio padrão). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$

LDL-C [grupos]	G-1 [133,2 $\pm$ 35,7]	G-2 [132,6 $\pm$ 42,3]	G-3 [130,7 $\pm$ 33,8]	G-4 [136,5 $\pm$ 42,5]
G-1 (60 - 110)	—	0,948	0,594	0,300
G-2 (111 - 125)	0,948	—	0,842	0,665
G-3 (126 - 139)	0,594	0,842	—	0,243
G-4 ( $\geq$ 140)	0,300	0,665	0,243	—

**TABELA VI**

Análise de variância para Triglicérides, para amostra classificada em grupos de 1 a 4 (G1 a G4) pela glicemia em jejum. Estão representados os valores de probabilidade e as médias ( $\pm$  desvio padrão). O nível de significância considerado foi  $p < 0,05$

Triglicérides [grupos]	G-1 [129,0 $\pm$ 90,7]	G-2 [178,8 $\pm$ 184,3]	G-3 [166,0 $\pm$ 60,4]	G-4 [204,7 $\pm$ 222,1]
G-1 (60 - 110)	—	0,078	0,013	< 0,001
G-2 (111 - 125)	0,078	—	0,678	0,368
G-3 (126 - 139)	0,013	0,678	—	0,015
G-4 ( $\geq$ 140)	< 0,001	0,368	0,015	—

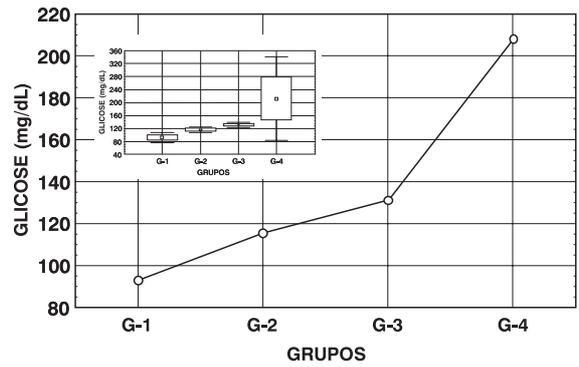


Figura 2. Valores médios para determinação de glicose, classificados em grupos de 1 a 4 pela glicemia em jejum. No insert, (o) representa os valores médios, ( ) 1 desvio-padrão e (L) dois desvios-padrão.

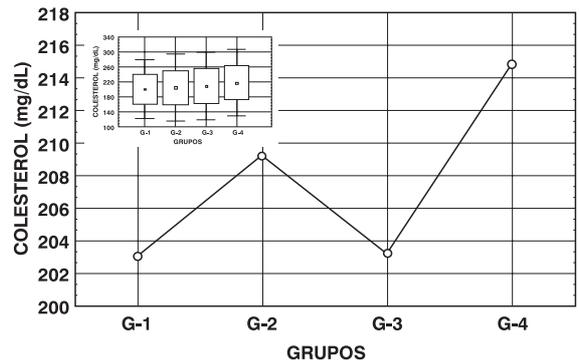


Figura 3. Valores médios para determinação de colesterol total, classificados em grupos de 1 a 4 pela glicemia em jejum. No insert, (o) representa os valores médios, ( ) 1 desvio padrão e (L) dois desvios-padrão

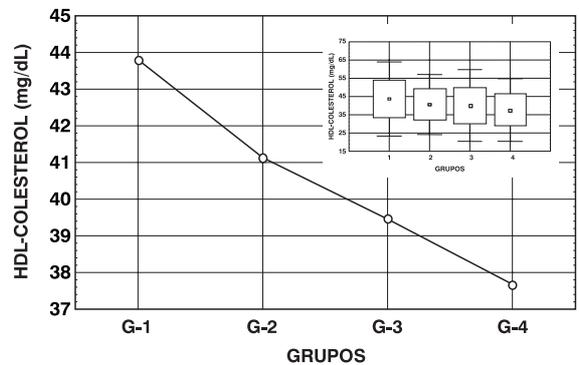


Figura 4. Valores médios para determinação de HDL-Colesterol, classificados em grupos de 1 a 4 pela glicemia em jejum. No insert, (o) representa os valores médios, ( ) 1 desvio-padrão e (L) dois desvios-padrão

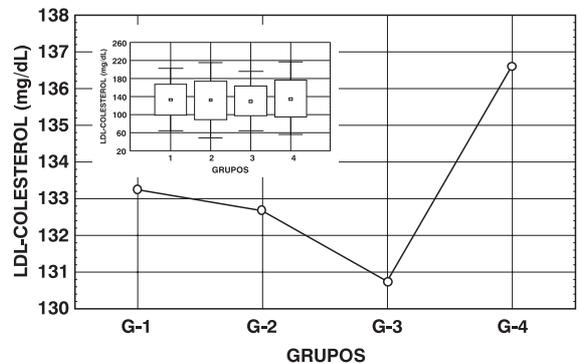


Figura 5. Valores médios para determinação de LDL-Colesterol, classificados em grupos de 1 a 4 pela glicemia em jejum. No insert, (o) representa os valores médios, ( ) 1 desvio -padrão e (L) dois desvios-padrão

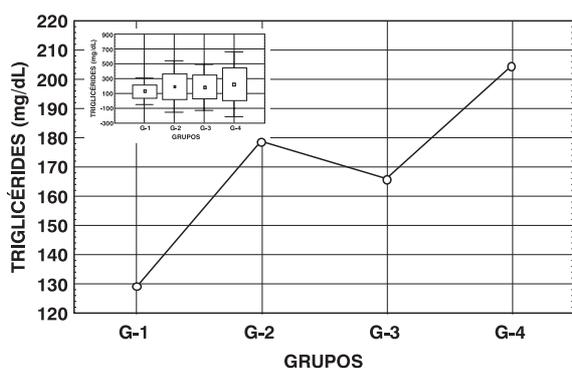


Figura 6. Valores médios para determinação de Triglicérides, classificados em grupos de 1 a 4 pela glicemia em jejum. No insert, (o) representa os valores médios, ( ) 1 desvio-padrão e (L) dois desvios-padrão

senta um fator de risco cardiovascular independente e a macroangiopatia é responsável por 80% da mortalidade na população diabética<sup>3,13</sup>.

A análise do perfil lipídico, definido pelo Consenso Brasileiro sobre Dislipidemia, como as determinações de Colesterol total, HDL-C; LDL-C e Triglicérides é relevante para todo diabético, pelo aumentado risco para doença arterial coronária (DAC) nesta população, sendo atualmente o *Diabetes mellitus* considerada um fator de risco independente para DAC<sup>18</sup>.

Neste trabalho classificamos uma amostra de 1000 pacientes, pelo valor da glicemia em jejum com o objetivo de avaliar se a implementação dos novos critérios para o diagnóstico do *Diabetes mellitus*, apresenta alteração no perfil lipídico. Seria possível, portanto que a redução da glicemia em jejum para 126 mg/dL proposta nos "novos critérios diagnósticos" (em contrapartida ao *cut off* de 140 mg/dL anterior) implicasse também em valores para o perfil lipídico que demonstrasse menor risco para DAC, uma vez que o paciente em tese seria diagnosticado de modo mais precoce.

A distribuição dos níveis glicêmicos nos grupos classificatórios encontra-se na Tabela II e Figura 2. É importante ressaltar que na amostra estudada não foi obtida diferença significativa entre os grupos G-2 e G-3 ( $p = 0,083$ ).

Os dados de análise de variância (Anova) para a determinação de colesterol total (Tab. III), mostram que na amostra estudada não foi possível encontrar diferenças significativas para a determinação de colesterol total entre os grupos G-1 (normoglicêmicos) e os grupos G-2 (glicemia entre 111 e 125 mg/dL) e G-3 (glicemia entre 126 e 139 mg/dL). Os grupos G-1 e G-4 (glicemia  $\geq 140$  mg/dL) apresentaram diferença significativa ( $p = 0,0014$ ). Níveis glicêmicos elevados, como os apresentados no G-4 caracterizam pacientes com mais tempo da doença, o que aumenta a possibilidade de alterações no perfil lipídico<sup>11</sup>, como evidenciado aqui para o colesterol total. Foi observada uma diferença significativa entre os grupos G-3 e G-4 ( $p = 0,042$ ), que também poderia ser explicada pela hipótese anteriormente descrita, entretanto não é possível descartar a possibilidade de um artefato no tamanho e composição da amostra em estudo, pela significância encontrar-se próxima a 5% e pela distribui-

ção encontrada das médias nos grupos, caracterizada na Figura 3.

O nível de colesterol na lipoproteína de alta densidade (HDL-C) é um fator de risco negativo para DAC<sup>17</sup>. Os grupos 3 e 4, diferiram significativamente do grupo 1 (Tabela. 04;  $p < 0,001$  e  $p < 0,001$ , respectivamente). O grupo 4 não foi significativamente diferente do grupo 3 ( $p = 0,177$ ). Estes dados sugerem que valores de glicemia iguais ou superior a 126 mg/dL (G-3) já apresentam níveis de HDL-C significativamente diminuídos em relação ao grupo normoglicêmico (G-1). Uma redução quase linear nos níveis de HDL-C pode ser observada de G-1 a G-4 (Figura 4). A forte correlação inversa entre o HDL-C e os triglicérides pode ser um dos componentes responsáveis pelo comportamento apresentado por esta variável<sup>8</sup>.

O LDL-C tem se apresentado como o mais importante marcador para DAC no perfil lipídico<sup>23</sup>. As análises de variância não apresentaram diferenças significativas entre os grupos em estudo (Tabela V). Os dados sugerem que este parâmetro, na amostra em estudo, não apresenta correlação com os níveis glicêmicos. A equação de Friedewald para estimar o LDL-C, empregada neste trabalho sofre interferência dos níveis de triglicérides<sup>18</sup>. Portanto, a análise do comportamento do LDL-C deve ser avaliada com cautela neste trabalho, sendo que novas determinações do LDL-C por métodos diretos poderão dirimir as dúvidas do comportamento desta fração<sup>5</sup>. A Figura 6 evidencia a distribuição randômica das médias da LDL-C.

A hipertrigliceridemia é, em vários estudos epidemiológicos, um fator importante de risco cardiovascular<sup>1,3</sup>. O grupo 1 mostrou-se significativamente diferente dos grupos 3 e 4 (Tabela VI;  $p = 0,013$  e  $p < 0,01$ , respectivamente). Os grupos 3 e 4, também se mostram diferentes ( $p = 0,015$ ). A mobilização dos ácidos graxos quando a metabolização da glicose não ocorre de modo eficaz, como no *Diabetes mellitus*, produz a já descrita elevação nos triglicérides<sup>11,17</sup>. A tendência à elevação nos triglicérides à medida que a glicose aumenta (G-1 à G-4, Figura 6) pode sugerir a precocidade da elevação dos triglicérides quando o metabolismo da glicose é alterado e o realçar um dos fatores para elevar o risco para DAC no paciente com diabetes.

## CONCLUSÕES

Nossos dados mostram para a amostra analisada que:

- 1) os normoglicêmicos (grupo 1), mostraram níveis significativamente menores ( $p < 0,001$ ) nas determinações de colesterol total, HDL-C e triglicérides quando comparados ao grupo que apresenta glicemia maior ou igual a 140 mg/dL (grupo 4),
- 2) a determinação de LDL-Colesterol não apresentou diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os grupos estudados;

- 3 os níveis de colesterol total e triglicérides foram significativamente menores ( $p = 0,042$  e  $p = 0,015$ , respectivamente) entre os grupos G-3 (glicemia: 126 – 139 mg/dL) e G-4 (glicemia: > 140 mg/dL)
- 4) os dados sugerem que a redução no *cut off* para diagnóstico do *diabetes mellitus* pela Associação Americana de Diabetes ( $\geq 126$  mg/dL) possibilita detectar indivíduos diabéticos com níveis menores de colesterol e triglicérides quando comparados ao critério antigo preconizado pela Organização Mundial da Saúde ( $\geq 140$  mg/dL)

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Austin, M. A.; Hokanson, J. E. e Edwards, K. L. Hypertriglyceridemia as a cardiovascular risk factor. *Am. J. Cardiol.*, 81:7-12B, 1998.
2. Balkau, B.; Eschwege, E.; Tichet, J.; Marre, E. O. O. Grupo de Estudo D.S.E.I.R.. Critérios Propostos para o Diagnóstico do Diabetes: Evidência de um Estudo Epidemiológico Francês (D.E.S.I.R.). *Diabetes & Metabolism*, São Paulo, p.151-157, fev., 1998.
3. Brun, J. M.; Qual o objetivo de hipertrigliceridemia enquadrar-se no tratamento do Diabetes não Insulino-dependente? *Diabetes & Metabolism*, 23(3):258-63,1997.
4. Brun, J. M.; Drouin, F.; Berthezene, F.; Jacotot, B.; Pometta, D. As Dislipidemias do Paciente Diabético. *Diabetes & Metabolism*, 21(1): 59-62, 1995;
5. Burtis, C. A. e Ashwood, E. R. (Ed.) *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999.
6. Chacra, A. R. Diabetes e Economia da Saúde. *Diabetes Metab.*, São Paulo, p. 232-233, maio, 1998.
7. Gimeno; S. G; Ferreira S. R.; Franco L. J.; Iunes; M. Comparison of glucose tolerance categories according to World Health Organization and American Diabetes Association diagnostic criteria in a population-based study in Brazil. The Japanese-Brazilian Diabetes Study Group. *Diabetes Care*, 21(1):1999-92, 1998.
8. Henry, J. B. (Ed.). *Diagnósticos Clínicos & Tratamento por métodos laboratoriais*. 18ª ed. São Paulo: Manole,1995, p.197-241.
9. Laako M. Hyperglycemia and cardiovascular disease in type 2 diabetes. *Prim Care*, 26(4): 829-39, 1999.
10. Lim S.C.; Tai, E.S.; Tan B.Y., Chew, S.K.; Tan, C.E. Cardiovascular risk profile in individuals with borderline glycemia: the effect of the 1997 American Diabetes Association diagnostic criteria and the 1998 World Health Organization Provisional Report. *Medline. Diabetes Care*. 23(3): 278-82, 2000.
11. Martinez, Tania L. R. *Condutas Clínicas nas Dislipidemias*. Belo Horizonte: Saúde, 1997, p.291.
12. Mayfield, J. Diagnosis and classification of *Diabetes mellitus*: new criteria. *Am. Fam. Physician*, 58(6):278-82, 2000.
13. O'Keefe, J. H. J.; Miles J. M.; Harris, W. H.; Moe, R. M.; Mccallister, B. D. Improving the adverse cardiovascular prognosis of type 2 diabetes. *Mayo Clin. Proc.*, 74(2):171-80, 1999.
14. Oliveira, J. E. P. *Diabetes mellitus – Um Problema de Saúde Pública*. *Ars Cvrandi*, Rio de Janeiro, p.12-13, set., 1999.
15. Oliveira, J. E. P.; Wajcberg, E.; Aguiar, R. S. B. Tratamento do *Diabetes mellitus* – Medidas não medicamentosas. *Ars Cvrandi*, Rio de Janeiro, set.,1999, p.29- 31.
16. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of *Diabetes mellitus*. *Diabetes Care*, 20(7):1183-97, 1997.
17. Rifai, N.; Warnik, G.R. e Dominiczak, M.H. *Handbook of lipoprotein testing*. Washington: AACCC Press, 1997.
18. SBC – Sociedade Brasileira de Cardiologia. Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias. *Atheros* 10(4):109-120, 1999.
19. SBD – Sociedade Brasileira de Diabetes. Programa Harvard Joslin - Educação em diabetes no Brasil. Aspectos fundamentais do diagnóstico e tratamento do *Diabetes mellitus*. Harvard Medical Internacional Joslin Diabetes Center. Maringá, 1996.
20. Sherwin, Robert S. *Diabetes mellitus*. In: Goldman, Lee e Bennett, J. C. (Ed.) *Cecil textbook of medicine*. 21st ed. Philadelphia: Saunders, 2000, p.1263-84.
21. Sievenpiper, J. L.; Jenkins, D. J.; Josse, R. G.; Vuksan, V. Dilution of the 75-g oral glucose tolerance test improves overall tolerability but not reproducibility in subjects with different body composition. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 51(2):87-95, 2001.
22. STATSOFT, *Inc Statistica for Windows* (Computer program manual). Tulsa, 1996. 1 CD-ROM.
23. Wilson, P.W. Metabolic risk factors for coronary heart disease: current and future prospects. *Curr. Opin. Cardiol.*, 14(2):176-85, 1999.

Endereço para correspondência:

Prof. Geraldo Picheth  
 Disciplina de Bioquímica Clínica  
 Depto. de Patologia Médica – Universidade Federal do Paraná  
 Rua Prefeito Lothário Meissner, 3400 – Jardim Botânico  
 80210-170 Curitiba – PR  
 E-mail: gpicheth@subsede.ufpr.br

## TEMAS LIVRES

### Prêmio HOTSOFT

**Categoria: “Melhor programa de informática aplicada ao laboratório”**  
**Valor equivalente a R\$ 1.000,00**

Será concedido um prêmio ao programa apresentado e selecionado na sessão de Temas Livres dos congressos promovidos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.  
 A premiação será feita na sessão de abertura, com a entrega do diploma.

Para concorrer ao prêmio, os interessados devem solicitar as informações necessárias à

**Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**  
 Rua Vicente Licínio, 95 • Rio de Janeiro, RJ • 20270-902  
 Tel (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2234-4881  
 e-mail: congresso@sbac.org.br

# Avaliação imunológica e hematológica de pacientes com doença linfoproliferativa crônica

## Immunological and hematological avaliation of patients with chronic lymphoproliferative disease

Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior<sup>1</sup>; Valéria Soraya de Farias Sales<sup>1</sup>; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca<sup>2</sup>; Maria Zélia Fernandes<sup>2</sup>; Aldair de Souza Paiva<sup>2</sup>; Francisco Fernandes do Nascimento Júnior<sup>2</sup>; Maria Cleide de Araújo Lopes<sup>2</sup>; Roberto Chaves de Vasconcelos<sup>2</sup> & Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva<sup>1</sup>

**RESUMO** – As doenças linfoproliferativas crônicas (DLC) são desordens do sistema linfóide, caracterizadas pela proliferação anormal de linfócitos maduros, envolvendo principalmente linfócitos B, podendo também acometer linfócitos T e células natural *killer*. Neste trabalho foram imunofenotipados 50 pacientes portadores de DLC (27 homens e 23 mulheres) através da citometria de fluxo, empregando um painel de anticorpos monoclonais, constituído por: CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD10, CD19, CD22, CD23, CD25, CD38, CD45, CD16/CD56, HLADR e anticadeias leve e pesada das imunoglobulinas. Adicionalmente, também, se investigou informações referentes aos pacientes, tais como idade, sexo, além de dados clínicos e laboratoriais dentre os quais a presença de linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, leucometria, análise citomorfológica do sangue periférico, contagem de plaquetas e dosagem de hemoglobina. Os resultados demonstraram que 43 casos foram de DLC de células B e 7 casos de DLC de células T. Os casos tipados como DLC de células B foram: 35 casos de leucemia linfocítica crônica (LLC), 3 casos diagnosticados como leucemia prolinfocítica de células B (LPL-B) e 3 como leucemia de células vilosas ou *hairy cell leukemia* (HCL) e um caso de linfoma da zona do manto em fase leucêmica (LCM) e outro de macroglobulinemia de Waldenström (MW). As DLC-T por sua vez foram: quatro casos de LPL-T, um caso de leucemia de células T do adulto ou *adult T cell leukemia* (ATL), um caso de síndrome de Sezary (SS) e também um paciente diagnosticado como linfoma de célula T periférico (LCTP). A correlação entre a imunofenotipagem e achados clínicos laboratoriais demonstraram que a linfadenopatia e a hepatomegalia foram os achados clínicos mais presentes ao passo que nível elevado de linfócitos leucêmicos circulantes foi o achado laboratorial mais freqüente nestas doenças. Estes achados demonstram a importância da imunofenotipagem como forma de investigar a natureza neoplásica de pacientes com linfocitose.

**PALAVRAS-CHAVE** – Doença linfoproliferativa crônica; Imunofenotipagem.

**SUMMARY** – The chronic lymphoproliferative diseases (CLD) are disorders of lymphoid sistem characterized by abnormal proliferation of mature lymphocytes involving more B cells, to be also occur in T lymphocyt an natural killer cells. In this study, we studied 50 patients (27 male and 23 female) with CLD. They were immunophenotyped using the flow cytometry with the panel of monoclonal antibody constituted by CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD19, CD22, CD23, CD25, CD38, CD45, CD16/CD56, HLADR and anti light and heavy chain of immunoglobulin. In addition, it also be investigated the information referring patients as age, sex and clinical and laboratorial date such as: lymphadenopathy, hepatomegaly, splenomegaly, leucometry, counters and cytomorphological analysis of cells in peripheral blood, platelet count and hemoglobin determination. The results demonstrated that 43 cases were B-cell disorders and 7 T-cell CLD. The B cell CLD distribution were: 35 cases of B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL), 3 B-cell prolymphocytic leukemia (B-PLL), 3 hairy cell leukemia (HCL), and one case of Waldenström macroglobulinemia (MW) and mantle cell lymphoma (MCL). The T-cell disorders were: 4 cases of T-cell prolymphocytic leukemia (T-PLL) and one case of adult T cell leukemia (ATL), Sezary syndrome (SS) and T-cell peripheral lymphoma (T-CPL). The correlation between the immunophenotyping and clinical/laboratorial features demonstrated that lymphadenopathy and hepatomegaly were more frequent clinical date and high level of circulated leukemic cells was the more frequent laboratorial date of this diseases. This dates demonstrated the importance of immunophenotyping seeking to stablins the malign origin of patients whit peripheral lymphocytosis.

**KEYWORDS** – Chronic lymphoproliferative diseases, Immunophenotyping.

### INTRODUÇÃO

As Doenças Linfoproliferativas Crônicas (DLC) representam um grupo de neoplasias do sistema lin-

fohematopoético que apresentam características clínicas, morfológicas e imunológicas heterogêneas. Constituem alterações clonais do sistema imune podendo envolver linfócitos B, T e células "natural killer" (NK)<sup>1,4</sup>.

Recebido em 20/7/2001

Aprovado em 7/8/2001

<sup>1</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT/UFRN); <sup>2</sup>Instituto de Onco-Hematologia de Natal (IOHN)

Dada a grande complexidade do sistema imune, não é surpresa que tumores que ali se originam sejam numerosos e complexos; existindo, por isto, a necessidade de métodos diagnósticos mais precisos, além da avaliação clínica e da análise citomorfológica, tais como a imunofenotipagem, a citogenética e a biologia molecular<sup>1,4</sup>.

Nos últimos anos, novas entidades vêm sendo bem caracterizadas através do emprego sistemático de painéis de anticorpos monoclonais (AcMo) possibilitando a identificação de antígenos de diferenciação celular conjuntamente com uma análise citomorfológica mais detalhada<sup>1,4</sup>.

Nessas doenças é importante a distinção entre leucemias crônicas primárias e a fase leucêmica dos linfomas não Hodgkin (LNH). As DLC, mais comuns são as de células B. Entretanto, várias outras entidades originárias de células T e NK, podem atualmente ser bem caracterizadas (Tabelas I e II e Figuras 1 e 2)<sup>1-6</sup>.

O objetivo deste trabalho foi de avaliar o perfil imunofenotípico de pacientes com DLC assim como a correlação destes achados com o perfil clínico, hematológico e faixa etária destes pacientes.

## CASUÍSTICA E METODOLOGIA

### Casuística

Foram analisados 50 portadores de DLC no momento do diagnóstico. Destes indivíduos foram coletados 5 mL de sangue em EDTA potássico para posterior exame hematológico e de imunofenotipagem, bem como, informações clínicas relacionadas à doença, tais como a presença de linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e trombocitopenia.

A anemia foi determinada pela presença de níveis de hemoglobina inferior a 13g/dL nos homens e 12g/dL nas mulheres, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde<sup>7</sup>, e a trombocitopenia, por sua vez, foi determinada quando a contagem de plaquetas estavam abaixo de 150.000/mm<sup>3</sup>.

### Metodologia

#### Parâmetros hematológicos

Parâmetros hematológicos tais como contagem de leucócitos, dosagem de hemoglobina e contagem de plaquetas foram realizadas no analisador hematológico *Cell-Dyn 3.000*.

A contagem diferencial e a análise citomorfológica dos leucócitos foram realizadas em distensões de

sangue periférico coradas pelo método de leishmann, nas quais foram contados 100 leucócitos em objetiva de imersão. As alterações morfológicas por sua vez foram devidamente anotadas na ficha de resultados.

### Imunofenotipagem

As imunofenotipagens foram realizadas com AcMo conjugados a fluorocromos como o Isotiocianato de Fluoresceína (FICT), a *Phicoeritrin* (PE) e o *Peridin*

**TABELA I**  
**Classificação da doença linfoproliferativa crônica**

Doenças Linfoproliferativas Crônicas de Células B	
1) Leucemias primárias	<ul style="list-style-type: none"> <li>Leucemia Linfóide Crônica (LLC)</li> <li>Leucemia Pró-Linfocítica (LPL)</li> <li>Leucemia de Células Pilosas ou <i>Hairy Cell Leukemia</i> (HCL)</li> <li>Leucemia de Células Pilosas; forma variante (HCLV)</li> </ul>
2) Linfomas não-Hodgkin em Fase Leucêmica (LNHL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Linfoma Folicular (LF)</li> <li>Linfoma de Células do Manto (LCM)</li> <li>Linfoma Esplênico com Linfócitos Vilosos (LELV)</li> <li>Linfoma Linfoplasmocitóide (Macroglobulinemia de Waldenström) (MW)</li> </ul>
3) Mieloma múltiplo	<ul style="list-style-type: none"> <li>Leucemia de Células Plasmáticas (LCP)</li> </ul>
Doenças Linfoproliferativas Crônicas de Células T e NK	
1) Leucemias Primárias	<ul style="list-style-type: none"> <li>Leucemia de Linfócitos Grandes e Granulares (LLG): Células T e NK</li> <li>Leucemia Prolinfocítica (LPL)</li> </ul>
2) Linfomas não-Hodgkin em Fase Leucêmica (LNHL)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Leucemia de Células T do Adulto ou <i>Adult T Cell Leukemia</i> (ATL)</li> <li>Síndrome de Sezary (SS)</li> <li>Linfoma de Células T Periférico (LCTP)</li> </ul>

Baseado em: Ruiz-Argüelles, G. J. & San-Miguel, J. F.<sup>1</sup>

**TABELA II**  
**Características imunológicas das doenças linfoproliferativas crônicas - DLC**

DLPC	DLPC de Células B								DLPC de Células T e NK					
	Ags	LLC	LPL	HCL	LF	LCM	LELV	MW	LCP	LGL	LPL	ATL	SS	LCTP
slg	+ ▶	+▶▶	+▶▶	+▶▶	+▶▶	+▶▶	+▶▶(♥)	- (♥)	-	-	-	-	-	-
CD10	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CD11c	-	-	+▶▶	+/-	-	-/+	-	-	-	-	-	-	-	-
CD19	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CD20	+▶	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CD22	+▶	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CD23	+	+	+	+	-	?	+	-	-	-	-	-	-	-
CD25	-	-	+	-	-	-	+	-	?	-	+▶▶	-	-	-
CD38	-	-	+	-	-	-	+/-	+▶▶	?	-	+▶▶	-	-	-
CD103	-	-	+▶▶	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HLADR	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+▶▶	-	-	-
FMHC	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
CD2	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CD3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CD4	-	-	-	-	-	-	-	-	-/+	+	+	+	+	+/-
CD5	+▶▶	-/+	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
CD7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-/+	-	-	-/+
CD8	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	+/-	-	-	-	-

**Ags** Antígenos  
**slg** Imunoglobulina de Superfície  
 - Ausência de Expressão Antigênica  
 + Presença de Expressão Antigênica  
 +/- Antígeno presente em menos de 50% dos pacientes  
 +/- Antígeno presente na maioria dos pacientes  
 ▶▶ Forte expressão antigênica  
 ▶ Fraca expressão antigênica  
 ♥ Presente no citoplasma  
 ♣ Positivo nas neoplasias de células T  
 ? Desconhecido

**LLC** Leucemia Linfóide Crônica  
**LPL** Leucemia Pró-Linfocítica  
**HCL** *Hairy Cell Leukemia*  
**LF** Linfoma Folicular  
**LCM** Linfoma de Células do Manto  
**LELV** Linfoma Esplênico com Linfócitos Vilosos  
**MW** Macroglobulinemia de Waldenström  
**LCP** Leucemia de Células Plasmáticas  
**LGL** Leucemia de Linfócitos Grandes e Granulares  
**ATL** Leucemia de Célula T do Adulto  
**SS** Síndrome de Sezary  
**LCTP** Linfoma de Célula T Periférico

Baseado em: Ruiz-Argüelles, G. J. & San-Miguel, J. F.<sup>1</sup>

*Chlorophyll Protein* (PerCP), possibilitando a realização de um painel para SLC com dupla e/ou tripla coloração.

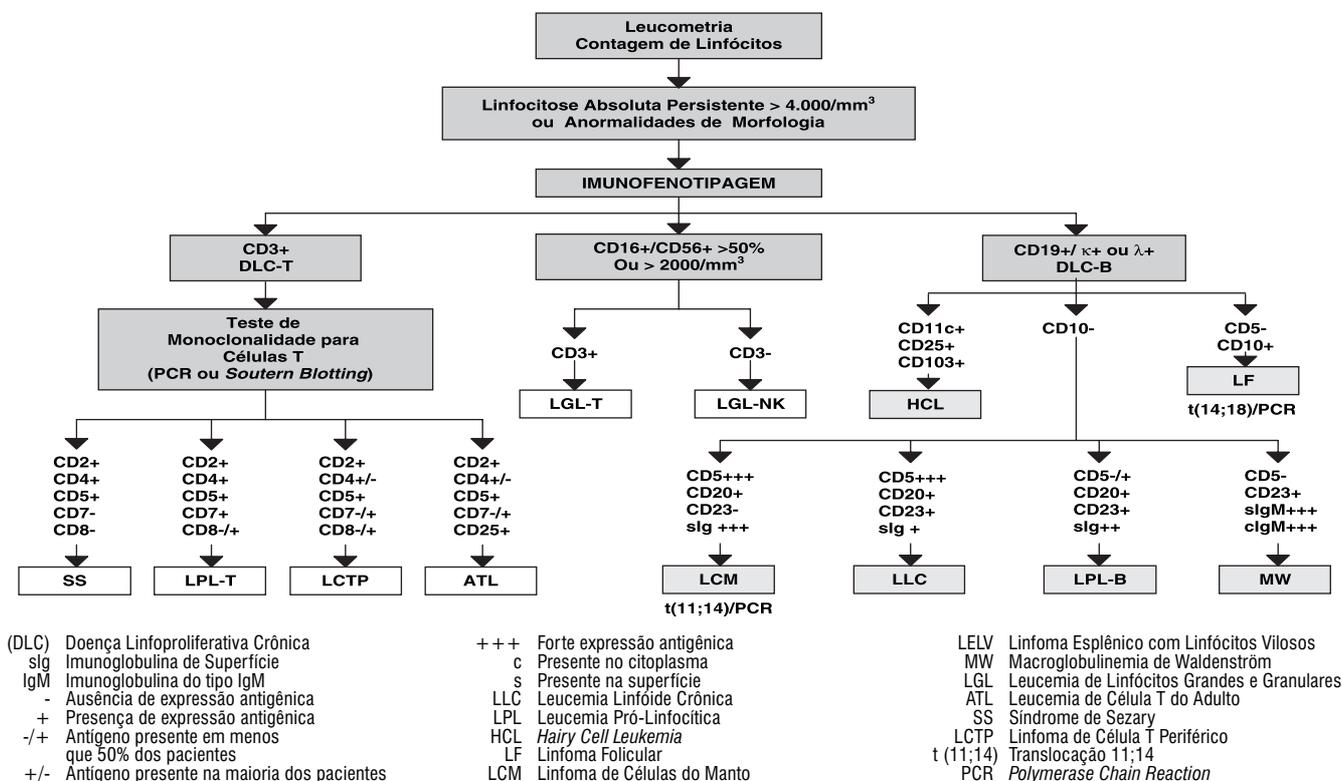
O painel de AcMo foi constituído de: CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD14, CD16, CD19, CD22, CD23, CD25, CD38, CD45, CD56, HLADR, anti-cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH), e anticadeias leves das imunoglobulinas *kappa* ( $\kappa$ ) e *lambda* ( $\lambda$ ), todos da *Becton & Dickinson*.

A imunomarcagem das células leucêmicas foi realizada em 100 microlitros ( $\mu$ L) de sangue total previamente homogeneizado, o qual foi incubado conjuntamente com 20 $\mu$ L de AcMo por 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. Após este período, a suspensão celular foi homogeneizada e adicionada à

mesma cerca de 2 mL de solução de lise (*Lysing Solution – Becton & Dickinson*), previamente diluído a 10% em água destilada, seguida de nova incubação por mais 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão celular foi centrifugada por 5 minutos a 1.500 rotações por minuto (rpm), o sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspensionado em solução salina tamponada com fosfatos ou *Phosphate Buffered Saline* (PBS), pH 7.4, e novamente centrifugada a 1.500rpm por 5 minutos, sendo este último procedimento repetido mais uma vez.

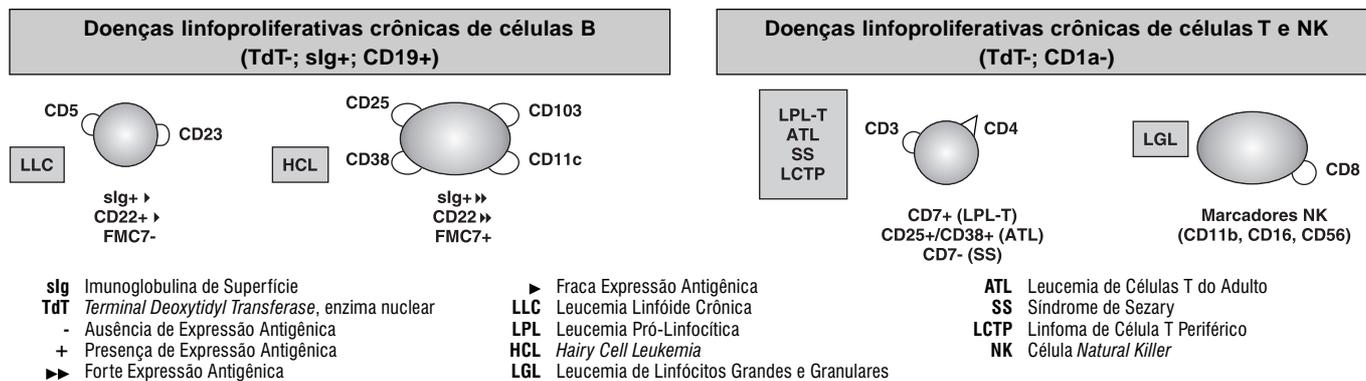
Ao final desta etapa, o sedimento foi então ressuspensionado em 1 mL de solução de formaldeído a 1% em PBS e guardado na geladeira, ao abrigo da luz, até o momento da análise.

**FIGURA 1**  
Fluxograma de imunofenotipagem para avaliação de linfocitose periférica



Baseado em: Weiss, R. L.<sup>2</sup>

**FIGURA 2**  
Características imunológicas das doenças linfoproliferativas crônicas



Baseado em: Matutes, E.<sup>3</sup>

Em todos os casos analisados foi utilizado um controle de autofluorescência inespecífica, com um conjugado IgG marcado com fluorocromos (Gama 1<sub>FICT</sub>/gama 2<sub>PE</sub> - Becton Dickinson).

Para a análise das cadeias leves ( $\kappa$  e  $\lambda$ ), foi necessário uma lavagem prévia da suspensão celular em PBS à 37°C. Tal procedimento se faz necessário para evitar a ligação do AcMo com as imunoglobulinas presentes no soro, bem como de ligações citofílicas do tipo inespecíficas. Em tal procedimento, 100 $\mu$ L de sangue total foi ressuspenso em PBS e centrifugada a 1.500 rpm, por 5 minutos duas vezes consecutivas, e só após este processo de lavagem, houve a incubação com o anticorpo específico (anti  $\kappa$ ,  $\lambda$ )<sup>8,9</sup>.

A análise foi realizada em um citômetro de fluxo (FACS-can da Becton Dickinson, San-José - Ca, USA), utilizando-se o programa Lysis II. Foi feita uma aquisição de 10.000 eventos, levando-se em conta os parâmetros *Forward Scatter* (FSC) em escala linear que avalia o tamanho celular, *Side Scatter* (SSC) também em escala linear, o qual avalia a complexidade e granulidade celular, além de FL1, FL2 e FL3 em escala logarítmica que detectam a fluorescência verde, laranja e vermelha, ou seja, a reação antígeno anticorpo conjugado ao FICT, PE e PerCP, respectivamente.

As imunofenotipagens foram consideradas positivas quando mais que 25% de células leucêmicas se ligaram aos AcMo. Os resultados foram fornecidos na forma de histogramas em percentagens da população celular com reação positiva ou negativa, além da intensidade de fluorescência.

## RESULTADOS

### 1) Imunofenotipagem

Dos pacientes analisados, 43 casos (86%) foram diagnosticados como DLC de células B e 7 (14%) de células T.

As DLC de células B foram classificadas da seguinte forma: 35 casos foram diagnosticados como Leucemia Linfocítica Crônica (LLC); 3 casos de Leucemia Pró-Linfocítica B (LPL-B); 3 como leucemia das células pilosas ou *Hairy Cell Leukemia* (HCL); um caso diagnosticado como Macroglobulinemia de Waldenström (MW) e um como linfoma de Células do Manto

**TABELA III**  
Características imunológicas dos pacientes com DLC-B

Nº	Diag	CD19	IgH	$\kappa/\lambda$	CD3	CD4	CD8	CD7	CD5	CD22	CD23	CD16/56	HLDR	CD45/CD14
01	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
02	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
03	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
04	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
05	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
06	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
07	HCL*	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
08	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
09	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
10	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
11	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
12	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
13	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
14	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
15	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
16	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
17	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
18	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
19	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
20	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
21	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
22	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
23	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
24	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
25	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
26	LPL	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
27	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
28	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
29	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
30	HCL*	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
31	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
32	HCL*	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
33	LPL	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
34	MW*	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
35	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
36	LPL	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
37	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
38	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
39	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
40	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
41	LCM	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-/-)	(+)	(+/-)
42	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)
43	LLC	(+)	(+)	(+/-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-/-)	(+)	(+/-)

DLC Doenças Linfoproliferativa Crônica

LLC Leucemia Linfóide Crônica

HCL *Hairy Cell Leukemia*

LPL Leucemia Pró-Linfocítica

LCM Linfoma de Células do Manto Leucemizado

+ Positivo

- Negativo

$\kappa/\lambda$  *Kappa/Lambda* – cadeias leves das imunoglobulinas

IgH Cadeia Pesada das Imunoglobulinas

MW Macroglobulinemia de Waldenström

\* CD38+/CD25+

▲ CD38+/CD25-

em fase Leucêmica (LCM), as quais apresentaram como característica imunofenotípica a expressão de antígenos B relacionados (CD19 e CD22), além da expressão monoclonal de imunoglobulina de superfície ( $\kappa$  ou  $\lambda$  *light chain*), bem como a ausência de antígenos de células T e células NK (Tabela III).

Os casos de LLC caracterizaram-se pela forte expressão do CD5, juntamente com imunoglobulina de superfície (sIg) fracamente reagente nas células leucêmicas, distinguindo-se imunofenotipicamente de outras DLPC-B, que expressavam forte densidade antigênica à sIg e reação ao CD5 fracamente positivo ou negativo.

Nos pacientes com HCL, observou-se reação nega-

**TABELA IV**  
**Características imunológicas dos pacientes com DLC-T**

Nº	Diag	CD19	IgH	$\kappa/\lambda$	CD3	CD4	CD8	CD7	CD5	CD22	CD23	CD16/56	HLADR	CD45/CD14
01	LPL	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(+/-)
02	LPL	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-/-)	(-)	(+/-)
03	LPL	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-/-)	(-)	(+/-)
04	LPL $\blacktriangle$	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-/-)	(-)	(+/-)
05	ATL $\blacktriangle$	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(+/-)
06	LCTL $\blacktriangle$	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-/-)	(-)	(+/-)
07	SS	(-)	(-)	(-/-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-/-)	(-)	(+/-)

**HCL** Hairy Cell Leukemia  
**DLC-T** Doenças Linfoproliferativas Crônicas de Células T  
**Diag** Diagnóstico  
 **$\kappa/\lambda$**  Kappa / Lambda – cadeias leves das imunoglobulinas  
+ Positivo  
- Negativo  
**LPL** Leucemia Pró-Linfocítica

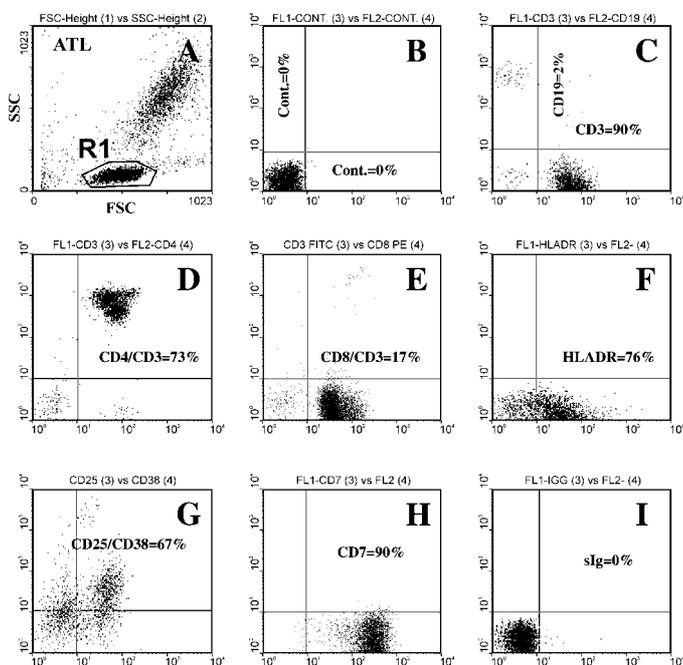
**LCTL** Linfoma de Célula T leucemizado  
**ATL** Leucemia de Célula T do Adulto  
**SS** Síndrome de Sezary  
**IgH** Cadeia Pesada das Imunoglobulinas  
 $\blacktriangle$  CD25-/CD38+  
 $\blacktriangle$  CD25+/CD38+

drome de Sezary (SS) e 1 caso de leucemia de célula T do adulto (ATL). Neste último, observou-se, adicionalmente, reação fortemente positiva ao CD25, CD38 e HLADR, além da sororeatividade ao Vírus Linfotrópico de Célula T Humana ou *Human T Cell Lymphotropic Virus* (HTLV) (Tabela IV e Figura 3).

## 2) Características gerais dos pacientes

Dos pacientes analisados, 27 casos (54%) eram do sexo masculino e 23 (46%) do sexo feminino. A faixa etária da população em estudo variou de 29 a 93 anos, sendo os indivíduos mais acometidos os de 60 anos ou mais, independente do sexo ou subtipo de doença (Tabela V).

**FIGURA 3**  
**Características imunofenotípicas de um caso de leucemia de células T do adulto**



A) Histograma de espalhamento luminoso do tipo FSC e SSC, com gate na região R1 (em destaque), correspondente à população linfóide; B) Dot Plot mostrando dupla marcação para controle de marcação inespecífica; C) Dot Plot demonstrando reatividade ao CD3 e negatividade ao CD19; D) Dot Plot com dupla expressão ao CD3 e ao CD4; E) Dot Plot demonstrando reatividade ao CD3 e negatividade ao CD8; F) HLADR positivo; G) Dot Plot demonstrando dupla expressão do CD25 e CD38; H) CD7 positivo; I) Imunoglobulina de superfície negativa

tiva ao CD5 em todos os casos, aliada a uma reação intensamente positiva a sIg, tendo sido também constatada positividade ao CD25 e ao CD38.

No indivíduo com LCM, observou-se um fenótipo caracterizado por forte expressão do CD5, aliada a uma forte marcação de sIg e negatividade ao CD23, possibilitando desta forma o diagnóstico diferencial com a LLC.

As DLC de células T, por sua vez, caracterizaram-se pela expressão de antígenos T (CD3, CD5, CD7, CD4 e/ou CD8) e ausência de reação aos antígenos B ou de células NK, sendo observado os seguintes subtipos imunológicos: 4 casos de leucemia pró-lymfocítica T (LPL-T), um caso de linfoma T leucemizado (LTL), 1 caso de sín-

drome de Sezary (SS) e 1 caso de leucemia de célula T do adulto (ATL). Neste último, observou-se, adicionalmente, reação fortemente positiva ao CD25, CD38 e HLADR, além da sororeatividade ao Vírus Linfotrópico de Célula T Humana ou *Human T Cell Lymphotropic Virus* (HTLV) (Tabela IV e Figura 3).

## 3) Dados clínicos da população analisada

Em relação aos aspectos clínicos relacionados, observou-se a predominância de linfadenopatia, seguida pela esplenomegalia, hepatomegalia e anemia. A trombocitopenia foi o dado clínico menos frequentemente encontrado em todos os subtipos imunológicos (Tabela VI).

## 4) Características hematológicas da população analisada

Informações hematológicas referentes aos pacientes encontram-se na Tabela VII, que consta de leucocytometria, contagem de linfócitos, granulócitos e plaquetas, além da dosagem de hemoglobina e análise citomorfológica dos leucócitos.

A leucocytometria variou de 7.800 a 180.000/mm<sup>3</sup>, sendo observada leucocytometria superior a 20.000/mm<sup>3</sup> na maioria dos casos. A linfocytose com contagens superiores a 60%, mostrou-se presente em todos os casos, demonstrando desta forma, ser este achado um importante marcador hematológico para estas neoplasias.

A contagem de granulócitos, por sua vez, manteve-se abaixo dos limites de normalidade em todos os casos analisados.

Alterações citomorfológica dos leucócitos mais comumente observadas na distensão sanguínea foram: a presença de restos nucleares de linfócitos (sombra nuclear de Grumprech) nos portadores de LLC, número elevado de pró-lymfócitos (>50%) nos casos de LPL, presença de *flower cells* na ATL e linfócitos pleomórficos com núcleo convolutos e de aspecto cerebri-forme no paciente com SS.

## DISCUSSÃO

As DLC com expressão leucêmica são neoplasias hematológicas caracterizadas pela proliferação e acúmulo de linfócitos aparentemente maduros, com transformação maligna, os quais envolvem principalmente

linfócitos B e mais raramente linfócitos T e células NK<sup>1,3-6</sup>.

Essas doenças geralmente acometem pessoas com idade superior a 50 anos, podendo ocasionalmente ocorrer em adultos mais jovens, afetando mais homens que mulheres, na proporção de 2:1, que tende a decrescer com o aumento da idade<sup>1,3-6</sup>, tendo sido estas características observadas no presente estudo.

A imunofenotipagem através da citometria de fluxo é atualmente o meio de investigação mais utilizado no estudo destas leucemias. Recursos tais como o emprego de anticorpos monoclonais conjugados a diferentes tipos de fluorocromos, possibilitam a identificação de diferentes antígenos em uma única célula, possibilitando uma melhor caracterização imunológica da população celular envolvida na leucemogênese<sup>1-5,8-13</sup>.

Nas DLC de células B, o painel de AcMo deve distinguir essas doenças das alterações reativas (não clonais), através da demonstração de monoclonalidade

pela expressão de cadeias leves das imunoglobulinas ( $\kappa$  ou  $\lambda$ ), na superfície celular ou no interior da mesma<sup>(1-6,8)</sup>. Desta forma, uma população de linfócitos B reativa deve conter uma mistura de células  $\kappa+$  e  $\lambda+$ , geralmente na proporção de 2:1. Em uma linfocitose maligna por sua vez, é observada uma população excedente expressando um único tipo de cadeia leve, geralmente células  $\kappa+$ . Os achados do presente trabalho estão condizentes com este relato, onde dos 43 casos diagnosticado como DLC-B, 37 apresentaram um fenótipo  $\kappa+$  e apenas 6 expressaram a cadeia leve  $\lambda$  das imunoglobulinas (Tabela III).

Relatos da literatura tem descrito a existência de casos raros de DLC-B de natureza biclonal (constituída por duas populações linfóides B uma  $\kappa+$  e outra  $\lambda+$ )<sup>9</sup>, não tendo sido detectado nenhum caso de DLC-B biclonal no presente trabalho.

As DLC-T são neoplasias pós-tímicas caracterizando-se, portanto, pelo fenótipo *terminal deoxytidyl transferase* (TdT) e CD1a negativos, aliado a positividade

**TABELA V**  
**Sexo e faixa etária dos pacientes estudados**

Faixa Etária	DLC	DLC-T					DLC-T			
		LLC-B nº = 35	LPL-B nº=03	HCL nº =03	LCM nº =01	MW nº =01	LPL-T nº =04	LCTP nº =01	ATL nº =01	SS nº =01
<b>Homens</b>										
< 30 – 40 a		00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	00 (-)	00 (-)
> 40 – 50 a		00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (25,0)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
> 50 – 60 a		03 (08,6)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (25,0)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
> 60 a		15 (42,8)	02 (66,6)	01 (33,3)	01 (100)	00 (-)	01 (25,0)	00 (-)	00 (-)	01 (100)
<b>Mulheres</b>										
< 30 – 40 a		00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
> 40 – 50 a		01 (02,9)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	00 (-)
> 50 – 60 a		04 (11,4)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)
> 60 a		12 (34,3)	01 (33,3)	02 (66,6)	00 (-)	01 (100)	01 (25,0)	00 (-)	00 (-)	00 (-)

**DLC** Doença Linfoproliferativa Crônica  
**LLC** Leucemia Linfóide Crônica  
**LPL-B** Leucemia Pró-Linfocítica B  
**HCL** *Hairy Cell Leukemia*  
**MW** Macroglobulinemia de Waldenström

**LPL-T** Leucemia Pró-Linfocítica T  
**LCTP** Linfoma de Células T Periférico  
**ATL** Leucemia de Célula T do Adulto  
**SS** Síndrome de Sezary  
**LCM** Linfoma de Células do Manto Leucemizado

**nº** Número total de casos testados  
**%** Percentual dos casos estudados  
**a** Anos de idade

**TABELA VI**  
**Dados clínicos dos pacientes estudados**

Faixa Etária	DLC	DLC-T					DLC-T			
		LLC-B nº = 35	LPL-B nº=03	HCL nº =03	LCM nº =01	MW nº =01	LPL-T nº =04	LCTP nº =01	ATL nº =01	SS nº =01
<b>Linfoadenopatia</b>										
Presente		30 (85,7)	03 (100)	03 (100)	01 (100)	01 (100)	03 (75,0)	01 (100)	01 (100)	00 (-)
Ausente		05 (14,3)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (25,0)	00 (-)	00 (-)	01 (100)
<b>Esplenomegalia</b>										
Presente		24 (68,6)	03 (100)	03 (100)	01 (100)	01 (100)	01 (25,0)	01 (100)	01 (100)	00 (-)
Ausente		11 (31,4)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	03 (75,0)	00 (-)	00 (-)	01 (100)
<b>Hepatomegalia</b>										
Presente		16 (45,7)	03 (100)	03 (100)	01 (100)	01 (100)	01 (25,0)	01 (100)	01 (100)	00 (-)
Ausente		19 (54,3)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	03 (75,0)	00 (-)	00 (-)	01 (100)
<b>Anemia</b>										
Presente		19 (54,3)	03 (100)	03 (100)	01 (100)	01 (100)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	00 (-)
Ausente		16 (45,3)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	04 (100)	01 (100)	00 (-)	01 (100)
<b>Trombocitopenia</b>										
Presente		16 (45,7)	02 (66,7)	03 (100)	01 (100)	01 (100)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	00 (-)
Ausente		19 (54,3)	01 (33,3)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	04 (100)	01 (100)	00 (-)	01 (100)

**DLC** Doença Linfoproliferativa Crônica  
**LLC** Leucemia Linfóide Crônica  
**LPL-B** Leucemia Pró-Linfocítica B  
**HCL** *Hairy Cell Leukemia*

**MW** Macroglobulinemia de Waldenström  
**LPL-T** Leucemia Pró-Linfocítica T  
**LCTP** Linfoma de Células T Periférico  
**ATL** Leucemia de Célula T do Adulto

**SS** Síndrome de Sezary  
**nº** Número de casos  
**%** Percentual de casos

**TABELA VII**  
**Parâmetros Hematológicos dos casos estudados**

Perfil hematológico	DLC	DLC-B					DLC-T			
		LLC-B	HCL	LPL-B	LCM	MW	LPL-T	LCTP	ATL	SS
		nº = 35	nº=03	nº =03	nº =01	nº =01	nº =04	nº =01	nº =01	nº =01
<b>L. (x 10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>		nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	
≤ 10,0 – 20,0		07 (20,0)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	01 (25,0)	00 (-)	00 (-)	
> 20,0 – 50,0		11 (31,4)	03 (100)	01 (33,3)	00 (-)	00 (-)	02 (50,0)	01 (100)	01 (100)	
> 50,0 – 100,0		10 (28,6)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	02 (25,0)	00 (-)	00 (-)	
> 100,0		07 (20,0)	00 (-)	02 (66,7)	01 (100)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	
<b>Linf. (%)</b>		nº (%)	nº (%)♦	nº (%)♥	nº (%)	nº (%)	nº (%)▼	nº (%)	nº (%)♠	
≤ 50 – 60		00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	
> 61 – 70		02 (05,7)	00 (-)	01 (33,3)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	
> 71 – 80		15 (42,9)	01 (33,3)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	02 (66,7)	01 (100)	00 (-)	
> 80		18 (51,4)	02 (66,7)	02 (66,7)	01 (100)	01 (100)	01 (33,3)	00 (-)	01 (100)	
<b>Linf. (%)</b>		nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	
≥ 05 – 20		19 (54,3)	01 (33,3)	03 (100)	01 (100)	01 (100)	01 (50,0)	01 (100)	01 (100)	
> 20 – 40		16 (45,7)	02 (66,7)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (50,0)	00 (-)	01 (100)	
> 40		00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	
<b>P. (x10<sup>3</sup>/mm<sup>3</sup>)</b>		nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	
≤ 150,0		16 (45,7)	03 (100)	03 (100)	00 (-)	01 (100)	02 (66,7)	00 (-)	00 (-)	
> 150		19 (54,3)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	00 (-)	01 (33,3)	01 (50,0)	01 (100)	
<b>Hb (H)</b>		nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	
< 13,0 g/dl		08 (22,8)	01 (33,3)	02 (66,7)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	
≥ 13,0 g/dl		10 (28,6)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	00 (-)	03 (100)	01 (100)	00 (-)	
<b>Hb (M)</b>		nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	nº (%)	
< 11,5 g/dl		10 (28,6)	02 (66,7)	01 (33,3)	00 (-)	01 (100)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	
≥ 11,5 g/dl		07 (20,0)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	01 (100)	00 (-)	

**DLC** Doença Linfoproliferativa Crônica  
**P. Hemat.** Parâmetros Hematológicos  
**LLC** Leucemia Linfóide Crônica  
**LPL-B** Leucemia Pró-Linfocítica B  
**HCL** *Hairy Cell Leukemia*  
**LCM** Linfoma de Células do Manto  
**MW** Macroglobulinemia de Waldenström  
**LPL-T** Leucemia Pró-Linfocítica T  
**ATL** Leucemia de Célula T do Adulto

**LCTP** Linfoma de Células T Periférico  
**SS** Síndrome de Sezary  
**H** Homem  
**M** Mulher  
**L.** Contagem de Leucócitos  
**Linf.** Contagem de Linfócitos  
**Gran.** Contagem de Granulócitos  
**P.** Contagem de Plaquetas  
**Hb** Dosagem de Hemoglobina

nº Número de casos  
% Percentual  
© Pró-linfócitos > 50%  
♦ Linfócitos pilosos  
♠ *Flower cells*  
♣ Linfócitos pleomórficos com núcleo convoluto  
nº Número de casos  
% Percentual

para um ou mais marcadores de células T<sup>1-6,26</sup>. Nestas neoplasias, entretanto, a imunofenotipagem tem um valor diagnóstico limitado, decorrente principalmente do fato de não existir um marcador imunológico de clonalidade para proliferação de células T e, portanto, algumas alterações reativas (não clonais) de células T podem exibir expressões antigênicas similares a uma DLC-T. Esta dúvida é facilmente resolvida por análises moleculares utilizando a reação em cadeia da polimerase ou *polymerase chain reaction* (PCR) ou pelo *southern blotting*<sup>1,2,4,17,26,27</sup>.

Entretanto, informações adicionais devem ser observadas através da expressão de fenótipos aberrantes tais como: CD4+/CD8+, CD4-/CD8-, baixa densidade antigênica do CD3, além de perdas de antígenos T, tais como o CD2, CD3, CD5, e o CD7<sup>4,26,27</sup>. Neste trabalho, observou-se uma aberração de fenótipo em alguns casos de DLC-T tais como a presença de células CD4+/CD8+ em um caso de LPL-T, perda de CD5 e CD7 em um caso de LPL-T e SS, além da baixa densidade antigênica do CD3 na maioria dos casos (Tabela IV e Figura 5).

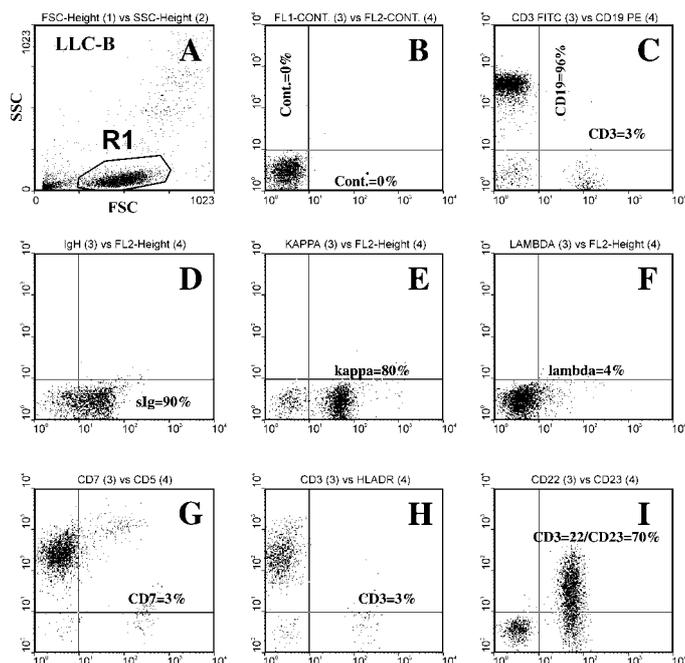
A LLC é tipicamente uma doença de idosos, a qual se caracteriza por linfocitose persistente, sendo comum em estágios mais avançados a presença de linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e, eventualmente, severa deficiência funcional da medula óssea. A morfologia celular é mais uniforme (monotonia celular), com predomínio de células maduras de pequeno tamanho, com núcleo de cromatina densa e citoplasma finamente

basofílico. Nestas leucemias, é observado ainda pequeno percentual de pro-linfócitos e restos nucleares de linfócitos que se rompem na confecção da distensão sanguínea<sup>1,6,13,16</sup>.

Imunologicamente, as células leucêmicas da LLC caracterizam-se pela expressão fracamente positiva de sIgs de natureza monoclonal (κ+ ou λ+), reagindo também com AcMo que identificam linfócitos B, tais como: CD19, CD20, CD22 e CD23, caracterizando-se também pela expressão aberrante do CD5, razão pela qual este antígeno tem sido empregado como marcador imunológico dessas leucemias, o qual, conjuntamente com o padrão de reatividade à sIg, possibilita o diagnóstico diferencial entre a LLC e outras DLC-B como a HCL e LPL-B que são CD5 negativas, além de expressarem fortemente a sIg<sup>2,4,14-25,26</sup>.

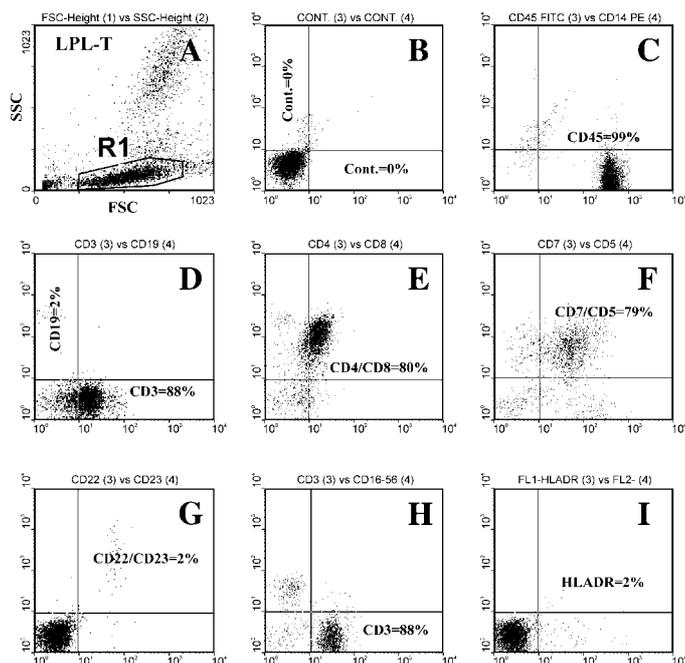
No presente estudo, observou-se leucometria elevada na maioria dos casos, estando a linfocitose persistente (>60%) onipresente em todos os pacientes analisados, os quais expressaram imunofenotipicamente: CD19, CD22, CD23 e HLADR, aliado à expressão aberrante do CD5, associada com uma reação fracamente positiva a sIgs, possibilitando desta forma distinguir estas leucemias de outras DLC-B, tais como, a LPL-B e a HCL. Nestes casos, vale a pena salientar a importância da realização de dupla marcação (CD5+/CD22+ ou CD5+/CD7-), descartando, desta forma, a possibilidade de marcação de linfócitos T, conforme podemos ver nas Figuras 4 e 6.

**FIGURA 4**  
Características imunofenotípicas de um caso de leucemia linfocítica crônica



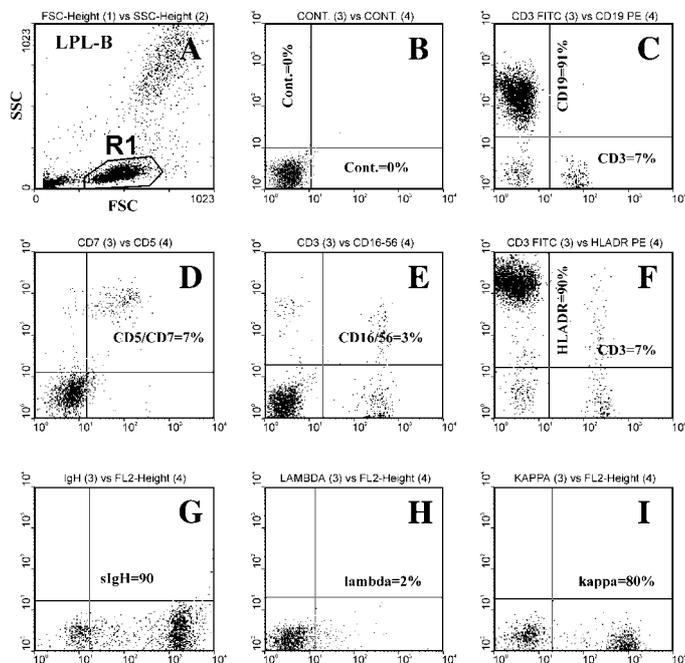
A) Histograma de espalhamento luminoso do tipo FSC e SSC, com *gate* na região R1 (em destaque), correspondente à população linfóide; B) *Dot plot* mostrando dupla marcação com controle de marcação inespecífica; C) *Dot Plot* demonstrando dupla marcação com forte expressão do CD19 e negatividade ao CD3; D) Baixa intensidade de expressão da cadeia pesada das imunoglobulinas; E e F) Expressão da cadeia leve kappa e negatividade de cadeia lambda (monoclonalidade); G) *Dot Plot* demonstrando dupla marcação com forte expressão do CD5 e negatividade ao CD7; H) *Dot Plot* demonstrando dupla marcação com forte expressão ao HLADR e negatividade ao CD3; I) *Dot Plot* demonstrando dupla positividade ao CD22 e ao CD23

**FIGURA 5**  
Características imunofenotípicas de um caso de leucemia pró-linfocítica de células T



A) Histograma de espalhamento luminoso do tipo FSC e SSC, com *gate* na região R1 (em destaque), correspondente à população linfóide; B) *Dot plot* mostrando dupla marcação de controle de marcação inespecífica; C) *Dot Plot* demonstrando forte expressão do CD45 e negatividade ao CD14; D) *Dot Plot* demonstrando positividade fraca ao CD3 e negatividade ao CD19; E) *Dot Plot* exibindo dupla reatividade ao CD4 e ao CD8; F) *Dot Plot* exibindo dupla marcação para o CD5 e CD7; G) *Dot Plot* demonstrando dupla negatividade ao CD22 e ao CD23; H) *Dot Plot* demonstrando exibindo reatividade ao CD3 e negatividade ao CD16; I) HLADR negativo

**FIGURA 6**  
Características imunofenotípicas de um caso de leucemia pró-linfocítica de células B



A) Histograma de espalhamento luminoso do tipo FSC e SSC, com *gate* na região R1 (em destaque), correspondente à população linfóide; B) *Dot plot* mostrando dupla marcação de controle de marcação inespecífica; C) *Dot Plot* demonstrando forte expressão do CD19 e negatividade ao CD3; D) *Dot Plot* demonstrando reação negativa ao CD5 e ao CD7; E) *Dot Plot* demonstrando com reação negativa ao CD16 e ao CD3; F) *Dot Plot* demonstrando com reação negativa ao CD3 e reatividade ao HLADR; G) Imunoglobulina de superfície com elevada expressão antigênica; H) Reação negativa para cadeia leve lambda das imunoglobulinas; I) Reação positiva para cadeia leve kappa das imunoglobulinas com forte expressão antigênica

A LPL é caracterizada por uma leucometria elevada, esplenomegalia volumosa e linfadenopatia. A célula leucêmica predominante é o pró-linfócito com contagens superiores a 50% (usualmente maior que 70%), sendo células com núcleo redondo, apresentando um nucléolo proeminente de cromatina moderadamente condensada<sup>1</sup>. Imunologicamente estas leucemias podem ser do tipo B ou T. As LPL-B caracterizam-se por expressão fortemente positiva para sIgs e reação negativa ao CD5 ou fracamente positiva na maioria dos casos, reagindo também com AcMo que identificam células B tais como o CD19, CD20, CD21, CD22 e CD23 dentre outros<sup>1,3,4,26</sup>.

Cerca da metade dos casos de LPL-T apresentam característica morfológica semelhante a LPL-B, entretanto, o formato nuclear pode ser mais irregular, podendo, em alguns pacientes, as células leucêmicas serem menores, apresentando também uma maior relação núcleo/citoplasma. O fenótipo mais comum é CD2, CD3, CD5, CD7, CD4 positivo e CD8 negativo, sendo mais raramente observado células CD4-/CD8+ ou células duplamente positivas (CD4+/CD8+)<sup>1,27</sup>.

A principal característica morfológica da HCL é a presença de células linfóides com projeções citoplasmáticas pilosas e irregulares (linfócitos pilosos ou *hairy cells*). São usualmente indivíduos pancitopênicos, cursando com esplenomegalia acentuada e linfadenopatia moderada. A medula óssea encontra-se geralmente infiltrada, apresentando nestes casos, fibrose, dificultando desta forma a realização do aspirado<sup>1,26</sup>.

Imunologicamente as células leucêmicas da HCL expressam altos níveis de sIgs monoclonal, sendo também fortemente reativas ao CD19, CD22, CD25, e ao HLADR e negativas ao CD5<sup>1,4,26</sup>, sendo o seu marcador mais específico o CD103, o qual não foi testado nas amostras do presente trabalho.

Como o próprio nome sugere, o linfoma esplênico de células vilosas (LELV) é um linfoma predominantemente esplênico, com linfadenopatia moderada. A contagem de leucócitos circulantes varia de normal a ligeiramente elevado às custas de linfócitos anormais, com núcleo de forma ovalado ou circular, cromatina levemente condensada exibindo um pequeno nucléolo. O volume do citoplasma é variável, moderadamente basofílico, com pequenas projeções vilosas, localizadas em um ou em ambos os pólos da célula. A imunofenotipagem revela um fenótipo de célula B madura, com expressão de CD19, CD20, CD22 e CD23, aliada à forte expressão de sIg, sendo negativo ao CD5, CD25 e CD38<sup>1,3,6-10,28,30</sup>, não tendo sido detectado nenhum caso de LELV no presente artigo.

A macroglobulinemia de Waldenström (MW) consiste em uma proliferação monoclonal de células linfóides B secretoras de imunoglobulina do tipo M (IgM), apresentando características imunofenotípicas intermediárias entre a LLC e LCP, com positividade ao CD19, CD22, sIgM, cIgM e CD38, apresentando também altos níveis de IgM no soro<sup>1,28</sup>.

A morfologia celular da leucemia de linfócitos grandes e granulares (LGL) é caracterizada pela presença de grandes linfócitos de citoplasma abundante, levemente basofílico com um pequeno número de grânulos azurófilos e núcleo redondo ou ovalado e ligeiramente excêntrico. A imunofenotipagem destas leucemias se caracteriza pela reatividade ao CD3, CD5, CD7 e CD8 nos casos T e reatividade ao CD16 e CD56 nos casos de LGL de células NK<sup>1,2-5,26</sup>, não sendo detectado nenhum caso de LGL no presente artigo.

A síndrome de Sezary (SS) cursa com linfócitos com contorno nuclear irregular e de aspecto cerebriforme. Imunologicamente, estes linfócitos são CD2+, CD3+, CD4+, CD5+, sendo negativo ao CD7 e ao CD8<sup>1,3,27</sup>, tendo sido diagnosticado 1 caso de SS no presente trabalho.

A ATL é uma DLC de células T, resultante de uma expansão clonal de linfócitos maduros que sofreram transformação neoplásica após infecção pelo retrovírus HTLV-I. A doença pode se apresentar como linfoma ou uma fase leucêmica, a qual, geralmente apresenta um curso clínico muito agressivo<sup>28</sup>. Os sinais clínicos da doença na fase leucêmica são: linfadenopatia, hipercalemia, hepatoesplenomegalia e elevada leucometria às custas de células linfóides que apresentam núcleo com contorno irregular (*flower cells*). A imunofenotipagem mostra um fenótipo de células T com reatividade ao CD2, CD3, CD4, CD25, CD38 e negatividade ao CD8<sup>1-3,28,30</sup>.

Estudos imunológicos e/ou histopatológicos indicam que o LCM se origina de região da zona do manto dos linfonodos secundários. Este linfoma acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, na proporção de 2:1, sendo mais observado em indivíduos

na sexta década de vida, cursando com linfadenopatia, esplenomegalia e freqüentemente com infiltração da medula óssea<sup>6,31</sup>.

Em sua fase leucêmica, o linfoma de células do manto (LCM), apresenta dificuldade de diagnóstico diferencial com a LLC, em razão da expressão do antígeno CD5 ser observado também no LCM. Entretanto, o fato de na LCM os linfócitos expressarem o antígeno CD20 e sIg (em geral IgM) com forte intensidade, aliada à ausência do CD23, permite o diagnóstico diferencial com a LLC<sup>30,31</sup>, fato este observado no presente trabalho.

As características clínicas dos portadores de linfoma folicular (LF) em sua fase leucêmica são semelhantes às observadas na LLC, cursando com linfadenopatia e esplenomegalia, a qual se torna volumosa nos indivíduos com leucometria elevada<sup>1</sup>. Imunologicamente os linfócitos do LF, são mais maduros que os da LLC, pois expressam em sua superfície, forte densidade antigênica do CD22 e sIg. Neste linfoma, entretanto, as características imunológicas mais marcantes são: a ausência do antígeno CD5 e forte expressão do CD10, não tendo sido observado nenhum caso de LF nas amostras analisadas do presente trabalho.

Adicionalmente, marcadores genéticos determinados pela PCR podem ser utilizados no diagnóstico diferencial do LCM e LF. Em aproximadamente 80-90% dos casos de LCM é detectado a translocação (11;14) (q13; q34) envolvendo o *locus* Ig do cromossomo 14 e o *locus* bcl-1, ou PRAD 1 localizado no cromossomo 11, este *locus* codifica a ciclina D1 um protooncogene envolvido na regulação do ciclo celular<sup>2,6,31,32</sup>. O LF, por sua vez, apresenta como marcador molecular a translocação (14; 18)<sup>1,2,6,33-35</sup>.

Finalizando, é importante ressaltar a importância dos dados hematológicos nestas neoplasias, destacando-se a presença de linfocitose persistente em todos os casos, a qual, aliada a uma análise citomorfológica cuidadosa e a imunofenotipagem celular, contribuíram para o diagnóstico e caracterização dos subtipos destas neoplasias.

## CONCLUSÕES

- 1) O emprego do painel de AcMo mostrou-se útil no diagnóstico e classificação imunológica das DLC.
- 2) O painel de AcMo utilizado, aliado a uma análise citomorfológica criteriosa, mostraram-se adequados no diagnóstico e caracterização dos diferentes subtipos imunológicos destas neoplasias.
- 3) A caracterização imunológica da LLC não ofereceu dificuldades mesmo em casos com leucometria pouco elevada, devido ao seu fenótipo característico como a reação positiva ao CD19; CD22; CD23; e HLA-DR, aliadas à expressão aberrante do CD5 e da imunoglobulina monoclonal fracamente positiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ruiz-Argüelles, G. J. and San-Miguel, J. F. *Actualización en Leucemias*, Editora Medica Pan-americana, 1ª edição, cap. 10, pág: 83-96, 1996.
2. *Interpretive Data Guide: test interpretation, utilization and references intervals*, Weiss, R. L. Editor, Arup Laboratories INC, Salt Lake City, USA, 1999.

3. **Matutes, E.** Contribution of immunophenotype in the diagnosis in classification of haemopoietic malignancies. *J. Clin. Pathol.* 48:194-197, 1995.
4. **Buccheri, V.** Diagnóstico das doenças linfoproliferativa crônica. – Temas de Hematologia (Programa Educacional e Conferências do XVI Congresso Nacional do Colégio Brasileiro de Hematologia – Belo Horizonte MG): 207-209, Belo Horizonte - MG, 1997.
5. **Harris, N. L.; Jaffe, E. S.; Stein H.; Banks P. M.; Chan J. K. C.; Cleary, M. L.; Delsol, G.; Wolf-Peeters, C. de F. B.; Gatter, K. C.; Grogan, T. M.; Isaacson, P. G.; Knowles, D. M.; Mason, D. Y.; Muller-Hermerlink, H. K.; Pileri, S. A.; Piris, M. A.; Ralfkiaer, E. and Warnke, R. A.** A revised european – american classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84 (5):1361-1391, 1994.
6. **Melo, N. B.** Leucemia linfóide crônica e doenças relacionadas: aspectos clínicos e diagnósticos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia Hemoterapia*, 1(1):38-46, 1996.
7. **WHO (World Health Organization) Technical Report Series**, Nº 405, 1968.
8. **Tbakin A.; Edinger, M. and Myles, J.** Flow cytometric immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas and related disorders. *Cytometry* 25:113-124, 1996.
9. **Jennings, D. C. and Foon, K. A.** Recent advances in flow cytometry: application to the diagnosis of hematologic malignancy. *Blood*. 90 (8):2863-2892, 1997.
10. **Orfao, A.; Ruiz-Argueles, A.; Lacombe, F.; Ault, K.; Basso, G.** Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica*, 80:69-81, 1995.
11. **Sollanki, D. L.; McCurdy, P. R. and MacDermott, R. P.** Chronic lymphocytic leukemia: a monoclonal disease. *American Journal of Hematology*, 13:159-162, 1982.
12. **Brohé, D.; Cauchie, P.; Nève, P.** Surface membrane immunoglobulin expression in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol.* 92: 50-51, 1994.
13. **Tubbs, R.R. et al.** Tissue immunomicroscopic evolution of monoclonality of B-cell lymphomas: comparison with cell suspension studies. *J. Clin. Pathol.* 76 (1): 24-28, 1981.
14. **Weinberg, D. S.; Pinkus, G. S. and Ault, K. A.** Cytofluorometric detection of B cell clonal excess: a new approach to the diagnosis of B cell lymphoma. *Blood*, 63 (5): 1080-1087, 1984.
15. **Hsi, E. D.; Holtge, G. and Tubbs, R.** Biclinal chronic lymphocytic leukemia. *Am. J. Clin. Pathol.* 113:798-804, 2000.
16. **Bennet, J. M.; Catovsky, D.; Daniel M. T.; Flandrin, G.; Galton D. A. G.; Gralnick H. R. and Sultan C.** The French-American-British (FAB) Cooperative Group. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukemia. *J. Clin. Pathol.* 42:567-584, 1989.
17. **Matutes, E. and Catovsky, D.** Mature T-cell leukemias and leukemia/lymphoma syndromes. Review of our experience in 175 cases. *Leukemia and Lymphoma* 4:81-91, 1991.
18. **Catovsky, D.; Fooks, J. and Richard, S.** Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: The importance of age, sex and response to treatment in survival. *British Journal of Haematology*. 72(2):141-149, 1989.
19. **Rozman, C. and Montserrat, E.** Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine*. 333(16):1052-1056, 1995.
20. **Bannerji, R. and Byrd, J. C.** Update on the biology of chronic lymphocytic leukemia. *Current Opinion in Oncology*. 12:22-29, 2000.
21. **Freedman, A. S.** Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 4 (2):405-429, 1980.
22. **Peter Gale, R. and Foon, K. A.** Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Hematology*, 24 (4):209-229, 1987.
23. **Ginaldi, L.; De Martinis, M.; D'Ostilio, A.; Loreto, F. M. and Quaglini, D.** The immunophenotypic analysis of chronic lymphoid leukemias. *The Cancer Journal*, 11(6):284-288, 1998.
24. **Thomas, J. K.** The CD5 B cell. *Adv. Immunol.* 117-185, 1989.
25. **Segal, G. H.; Masih, A. S.; Fox, A. C.; Jorgensen, T.; Scott, M. and Braylan, R. C.** CD5 expressing B cell non-Hodgkin's lymphoma with bcl-1 gene rearrangement have a relatively homogeneous immunophenotype and are associated with an overall poor prognosis. *Blood*, 85:1570-1575, 1995.
26. **Lavabre-Brertrand, T.; Janossy, G.; Exbrayat, C.; Bourquard, P.; Duperay, C.; and Navarro, M.** Leukemia-Associated changes identified by quantitative flow cytometry. II. CD5 over expression and monitoring in B-CLL. *Leukemia*, 8(9):1557-1563, 1994.
27. **Melo, J. V.; Catovsky, D. and Galton, D. A. G.** The relationship between chronic lymphocytic leukemia and prolymphocytic leukemia. Clinical and laboratory features for 300 patients and characterization of intermediate group. *British Journal of Haematology*, 63:377-387, 1986.
28. **Harris, N. I.; Jaffe, E.; Sadamori, N. et al.** A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood*, 84:1361-1392, 1994.
29. **Dinopoulos, M. A. and Alexanian, R.** Waldenström's macroglobulinemia. *Blood*, 83:1452-1459, 1994.
30. **Henderson, E. S.; Lister, T. A. and Greaves, M. F.** *Leukemia*, WB Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney and Tokyo; 6th Edition, chap. 28, pag: 596-602, 1996.
31. **Pittaluga, S.; Wlodarska, I.; Strul, M. S. T. J.; Verhoef, G.; Cassiman, J. J.; Van den Berghe, H. and de Wolf-Peeters, C.** Mantle cell lymphoma: a clinicopathological study of 55 cases. *Histopathology*, 26:17-24, 1995.
32. **Sarfati, M.** CD23 and chronic lymphocytic leukemia, *Blood Cell*, 19:591-596, 1996.
33. **Williams, M. E. and Swerdlow, S. H.** Cyclin D1 overexpression in non Hodgkin's lymphoma with chromosome 11 bcl-1 rearrangement. *Ann. Oncol.*, suppl., 51p, 71-73, 1994.
34. **Molina, T. J.; Delmer, A.; Cymbalista, F.; le Touneau, A.; Rerrot, J. Y.; Ramand, S.; Marrie, J. P.; Audoin, J.; Zittoun, R. and Diebold, J.** Mantle cell lymphoma, in leukaemic phase with prominent splenomegaly. A report of eight cases with similar clinical presentation and aggressive outcome. *Virchows Arch*, 437: 501-598, 2000.
35. **Lai, R.; Hirsch-Ginsberg, C. F. and Bueso-Ramos, C.** Pathologic diagnosis of acute lymphocytic leukemia in: *Hematology/Oncology Clinics of North America*, 14(6): 1209-1235, 2000.

Endereço para correspondência:  
 Prof. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior  
 Disciplina de Imunologia Clínica  
 Depto. de Análises Clínicas e Toxicológicas / DACT - Faculdade de Farmácia  
 Universidade Federal do Rio Grande do Norte/UFRN  
 e-mail: gbcjunior@hotmail.com

## TEMAS LIVRES

### Prêmio SBAC

**Categoria: "Melhor trabalho apresentado no Congresso"**

**Valor equivalente a US\$ 1.500,00**

**Será concedido um prêmio aos trabalhos apresentados e selecionados na sessão de Temas Livres dos congressos promovidos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.**

**A premiação será feita na sessão de abertura, com a entrega do diploma.**

**O trabalho vencedor desse prêmio poderá fazer parte da programação oficial do Congresso.**

**Para concorrer ao prêmio, os interessados devem solicitar as informações necessárias à**

**Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**

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

**Tel (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2234-4881**

**e-mail: congresso@sbac.org.br**

# O laboratório de análises clínicas na prevenção da formação de cálculo renal\*

## The clinical chemistry laboratory in the prevention of renal stone formation

Marlene Leiko Doi Sakuno<sup>1</sup>, Gisele Takahachi<sup>2</sup>, Mary Mayumi Taguti Irie<sup>2</sup> & Tatiana Shioji Tiومان<sup>3</sup>

**RESUMO** – A eliminação de cálculo renal de forma espontânea, através de processos cirúrgicos ou pela litotripsia pode ser o início e não o fim de uma doença calculosa renal. Para a prevenção desta doença é importante a realização de um estudo metabólico da litíase renal para tentar elucidar os mecanismos fisiopatogênicos responsáveis pela formação de cálculos renais. Este trabalho apresenta o resultado de um estudo realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá em 34 pacientes ( $\bar{x}$  = 36 anos) com cálculo renal atendidos nos anos de 1999/2000. Os principais distúrbios metabólicos encontrados foram hipernatriúria, alterações no pH urinário, hipocitratúria, hipercalemiúria e hiperfosfatúria. Este estudo revelou também que a ingestão hídrica é deficiente pois 76,5% dos pacientes apresentaram um volume urinário de 24 horas < 2L e, em 52% o índice de massa corporal (IMC) foi maior que o normal indicando a presença de sedentarismo e/ou dieta inadequada. Concluiu-se que a frequência na formação de novos cálculos pode ser diminuída através de um tratamento baseado no resultado de uma investigação metabólica; entretanto, há também necessidade de mudança no estilo de vida e nos hábitos alimentares.

**PALAVRAS-CHAVE** – Cálculo renal, estudo metabólico, prevenção.

**SUMMARY** – The elimination of renal stone in a spontaneous way, through surgical processes or for the lithotripsy can be the beginning of a stone disease but not its end. To prevent this disease it is important to realize a metabolic study of nephrolithiasis in order you can try to elucidate the pathophysiological mechanisms of renal stone formation. This work presents the result of a study accomplished at the Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) of the Universidade Estadual de Maringá involving 34 patients ( $\bar{x}$  = 36 years) with nephrolithiasis assisted in the years of 1999/2000. The most frequent metabolic disturbances were hypernatruria, alterations in the urinary pH, hypocitraturia, hypercalciuria and hyperphosphaturia. This study also revealed that the fluid intake is deficient because 76,5% of the patients presented an urinary volume of 24 hours < 2L and, in 52% the body mass index (BMI) was larger than the average indicating the presence of sedentary life and/or inadequate diet. We can conclude that the frequency in the formation of new stones can be reduced with a treatment based on the result of a metabolic investigation; however, it is important to change the lifestyle and the dietary habits.

**KEYWORDS** – Renal stone, metabolic study, stone prevention.

### INTRODUÇÃO

A eliminação de cálculo renal de forma espontânea através de processos cirúrgicos ou pela litotripsia pode ser o início e não o fim de uma doença calculosa renal. Estima-se que no Brasil esta patologia afeta 4 a 5% da população geral, aparecendo principalmente na faixa etária entre 20 e 30 anos e com recorrência muito elevada. Se medidas preventivas não forem adotadas cerca de 50% dos pacientes voltarão a formar novos cálculos dentro de 3 a 4 anos e 100% num período de 25 anos (6). Para a prevenção desta doença é importante a realização de um estudo metabólico da litíase renal para tentar elucidar os mecanismos fisiopatogênicos responsáveis pela formação de cálculos renais. Este trabalho apresenta o resultado de um estudo realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC) da Universidade Estadual de Maringá em 34 pacientes ( $\bar{x}$  = 36 anos) com cálculo renal atendidos nos anos de 1999/2000.

### MATERIAL E MÉTODOS

O estudo metabólico da litíase renal foi realizado em 18 indivíduos do sexo masculino (6 a 76 anos) e 16 do sexo feminino (13 a 57 anos) com cálculo renal. A avaliação laboratorial obedeceu o protocolo apresentado no Quadro 1.

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diversos fatores estão envolvidos na gênese da litíase renal tais como, fatores ambientais ou epidemiológicos (idade, sexo, hereditariedade, atividade física, ocupação, clima, dieta), estados de hiperexcreção urinária (cálcio, ácido úrico, oxalato, cistina, sódio), anormalidades no pH urinário e deficiência de inibidores da cristalização<sup>8</sup>.

A Figura 1 mostra o resultado do estudo metabólico realizado no LEPAC em 34 pacientes ( $\bar{x}$  = 36 anos) com cálculo renal atendidos nos anos de 1999/2000.

A Figura 2 apresenta o resultado da medida do volume de urina de 24 horas de 34 pacientes com cálculo renal.

Recebido em 16/7/2001

Aprovado em 8/8/2001

\*Trabalho realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Análises Clínicas (LEPAC), Depto. de Análises Clínicas (DAC), Univ. Est. de Maringá (UEM), PR  
<sup>1</sup>Docente da disciplina de Bioquímica Clínica, DAC, UEM; <sup>2</sup>Farmacêutica, LEPAC, UEM; <sup>3</sup>Acadêmica do curso de Farmácia, UEM

**QUADRO 1**  
Estudo metabólico da litíase renal

1. Urina I
2. Urocultura com antibiograma
3. pH urinário com 12 horas de restrição hídrica
4. Duas urinas de 24 horas: • volume • cálcio, fósforo, ácido úrico, sódio, cistina, creatinina, citrato, magnésio
5. Sangue em jejum de 12 horas: • cálcio, fósforo, ácido úrico, creatinina
6. Prova de sobrecarga oral de cálcio (quando solicitado)

lo renal. Podemos observar que 72,2% dos indivíduos do sexo masculino e 87,5% do sexo feminino apresentaram um volume urinário de 24 horas < 2L. O risco na formação de cálculos é elevado com um volume urinário inferior a 1 L/dia, sendo que este risco diminui quando o volume for maior que 2 L/dia<sup>1</sup>. A ingestão de líquidos é a modificação mais importante para todos os pacientes que tem cálculo sendo também a única recomendação que é aplicável a todas as formas de nefrolitíase independente da causa<sup>1,4</sup>.

A presença de hipernatúria em 61% dos homens e 44% das mulheres indica que a ingestão de sal está muito elevada. O sódio pode contribuir para a formação de cálculo renal através de vários mecanismos tais como, aumento na excreção de cálcio, diminuição na solubilidade do ácido úrico, aumento na excreção de cistina e redução no citrato urinário<sup>4,7</sup>.

Goldfarb<sup>3</sup> sugeriu que indivíduos com nefrolitíase são mais sensíveis ao efeito hipercalcúrico do sódio dietético. A hipernatúria também contribui para a hipocitrúria. A ingestão elevada de sódio afeta indiretamente a excreção urinária de citrato pois diminui os níveis de aldosterona no soro. A aldosterona é uma indutora da enzima citrato-sintetase na mitocôndria da célula renal. Portanto, sua diminuição leva a um decréscimo da síntese de citrato que é compensado pelo aumento na reabsorção tubular do mesmo<sup>2,5</sup>.

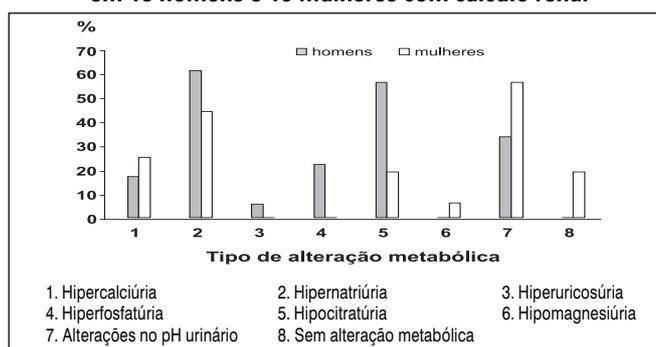
Neste trabalho a hipernatúria apresentou-se associada principalmente com hipercalcúria (29% nas mulheres e 9% nos homens) e com hipocitrúria (14% nas mulheres e 45% nos homens).

A detecção de hipernatúria no estudo metabólico é importante pois pequenas mudanças na ingestão de sódio podem provocar alterações significativas na excreção e na solubilidade urinária de substâncias litogênicas e assim diminuir a recorrência na formação de novos cálculos.

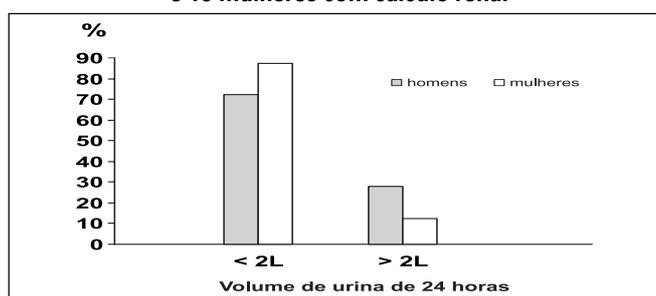
O citrato é um inibidor importante na formação de cálculos devido a sua capacidade de ligação com o cálcio diminuindo-se a quantidade de cálcio livre que poderia formar complexos com o oxalato e fosfato. O citrato também impede o crescimento de cristais de cálcio já formados. É um ácido tricarbônico que faz parte do Ciclo de Krebs, sendo livremente filtrado e excretado pelo rim<sup>2,5,8</sup>. A hipocitrúria foi detectada em 56% dos homens e 19% das mulheres. A avaliação do citrato urinário é importante devido a possibilidade de intervenção terapêutica através da administração exógena deste agente.

Uma entrevista e um inquérito alimentar realizados em parte desta população investigada revelaram alguns dados: início médio dos sintomas aos 26 anos tanto nos homens como nas mulheres e antecedentes

**FIGURA 1**  
Resultado do estudo metabólico da litíase renal realizado em 18 homens e 16 mulheres com cálculo renal



**FIGURA 2**  
Medida do volume de urina de 24 horas em 18 homens e 16 mulheres com cálculo renal



familiares freqüentes (45% nos homens e 75% nas mulheres). O índice de massa corporal (IMC) foi maior que o normal em 61% dos homens e 40% das mulheres indicando a presença de sedentarismo e/ou dieta inadequada. O inquérito alimentar revelou uma dieta com pouco líquido e geralmente na forma de refrigerantes.

Concluiu-se que a freqüência na formação de novos cálculos pode ser diminuída através de um tratamento baseado no resultado de uma investigação metabólica; entretanto há necessidade de mudança no estilo de vida e nos hábitos alimentares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Borghi, L.; Meschi, T.; Schianchi, T. et al. Urine volume: stone risk factor and preventive measure. *Nephron* 81(suppl 1): 31-37, 1999.
- Cunha, M. A.; Heilberg, I. P. & Schor, N. Citrato. In Schor, N. & Heilberg, I. P. *Calculose renal. Fisiopatologia, diagnóstico, tratamento*. Sarvier, São Paulo, 1995. p 26-28.
- Goldfarb, S. Dietary factors in the pathogenesis and prophylaxis of calcium nephrolithiasis. *Kidney Int.* 34: 544-555, 1988.
- Martini, L.A.; Heilberg, I. P. & Schor, N. Papel dos fatores dietéticos na litogênese. In Schor, N. & Heilberg, I. P. *Calculose renal. Fisiopatologia, diagnóstico, tratamento*. Sarvier, São Paulo, 1995. p 31-36.
- Rebelo, M. A. P. Hipocitrúria. In Schor, N. & Heilberg, I. P. *Calculose renal. Fisiopatologia, diagnóstico, tratamento*. Sarvier, São Paulo, 1995. p 105-113.
- Sakuno, M. L. D.; Akimoto, L. S.; Mereles, E. A. L. et al. Contribuição do laboratório de análises clínicas no diagnóstico metabólico da litíase renal. *Rev. Bras. Anál. Clín.* 26(3): 77-80, 1994.
- Sakuno, M. L. D. & Yassuda Filho, P. Hipernatúria e cálculo renal. *Laes & Haes* 124(2):152-154, 2000.
- Schor, N. & Heilberg, I. P. Fisiopatologia dos inibidores e agregadores da litogênese. In Schor, N. & Heilberg, I. P. *Calculose renal. Fisiopatologia, diagnóstico, tratamento*. Sarvier, São Paulo, 1995. p 14-16.

Endereço para correspondência:

Marlene Leiko Doi Sakuno  
Av. XV de Novembro, 89 - Maringá - PR - 87013-230  
E-mail: sakuno@onda.com.br

# Hematúria, hemoglobínúria e mioglobínúria na rotina do laboratório clínico - “compreender é preciso”

## Hematuria, hemoglobinuria and mioglobinuria in the clinical laboratory routine - “it is necessary to understand”

C. L. Melo & M. G. R. Queiroz

**RESUMO** – A presença de sangue sob as formas de hematúria e hemoglobínúria tem causado sérios problemas na prática diária, muitas vezes em virtude da não observância de alguns eventos que podem alterar significativamente o resultado laboratorial e a interpretação clínica da análise. Este trabalho tem por objetivo fornecer algumas informações acerca dos cuidados preliminares relacionados com a coleta adequada da urina, adoção de procedimentos técnicos padronizados no sentido de otimizar o resultado da análise e interpretação clínica da hematúria, hemoglobínúria e mioglobínúria verdadeiras. Com frequência, durante a análise da urina, utilizando tiras reativas, é possível encontrar situações em que há hematúria na sedimentoscopia sem hemoglobínúria e presença de hemoglobina com ausência de hemácias no sedimento urinário. Portanto, a hemoglobínúria não está obrigatoriamente condicionada à presença de hemácias visíveis ao microscópio. Isto significa que não se deve acrescentar hemácias à descrição do sedimento urinário para justificar o quadro de hemoglobínúria. A confiabilidade do resultado está na dependência das patologias associadas, alterações físico-químicas, coleta, transporte, processamento e análise adequados da amostra. Além do mais e de extrema importância, a anamnese e o exame físico do paciente devem ser relacionados cuidadosamente com o resultado laboratorial para que, sem nenhuma dúvida, seja firmado o diagnóstico e prescrita a conduta terapêutica acertada.

**PALAVRAS-CHAVE** – Hematúria, hemoglobínúria, mioglobínúria.

**SUMMARY** – The presence of blood under the hematuria and hemoglobinuria forms has been causing serious problems in the daily practice, a lot of times by virtue of the non observance of some events that can alter the laboratorial result and the clinical interpretation of the analysis significantly. This work has the objective to supply some information about of the preliminary cares related with the adapted collection of the urine, adoption of procedures aiming at the result of the analysis and clinical interpretation of the hematuria and true hemoglobinuria. Frequently, during the analysis of the urine, it is possible to find situations which there is hematuria in the microscopic examination without hemoglobinuria while in the strips of reaction and hemoglobin presence observed in the strips reaction with red blood cells absence in the urinary sediment. Therefore, the hemoglobinuria is not compulsory conditioned to the presence of visible red blood cells to the microscope. This means that it should not be increase red blood cells to the description of the urinary sediment to justify the hemoglobinuria. The reliability of the result is in the dependence of the related pathologies, alterations physical-chemistries and it collects, transport, processing and adequate of the sample analysis. Besides and of extreme importance, the anamnesis and the patients physical assesment should be related carefully with the laboratorial result so that, without any doubt, the diagnosis will be asserted and the right therapeutic conduct will be prescribed.

**KEYWORDS** – Hematuria, hemoglobinuria, mioglobinuria.

## INTRODUÇÃO

### Hematúria, hemoglobínúria e mioglobínúria

O achado de hematúria ou de hemoglobínúria é de grande importância clínica, mas deve ser avaliado com cautela, pois pode estar associado ou não a numerosos quadros patológicos. A presença de sangue na urina pode ser detectada sob duas formas: he-

mácias íntegras (hematúria) ou hemoglobina, produto da lise dos eritrócitos (hemoglobínúria). A hematúria verdadeira produz urina vermelha e turva enquanto que a hemoglobínúria e a mioglobínúria provocam o aparecimento de urina vermelha e límpida<sup>1,2,3</sup>.

A confiabilidade do resultado laboratorial no que diz respeito à identificação segura da hematúria e hemoglobínúria é dependente da qualidade da amostra analisada e da forma como são descritos os elementos observados nas pesquisas bioquímicas e na sedimen-

Recebido em 3/8/2001  
Aprovado em 8/8/2001

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - DACT - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem - FFOE - Universidade Federal do Ceará - UFC

toscopia. A padronização de procedimentos técnicos e descrição destes achados foi sugerida por Melo e cols.<sup>4</sup>. Os autores propuseram um modelo de padronização para o exame sumário de urina no sentido de eliminar ou pelo menos minimizar os problemas relacionados com a forma de transcrição e a interpretação dos resultados.

É de suma importância que o clínico estabeleça com segurança o diagnóstico diferencial entre hematúria, hemoglobinúria e mioglobinúria verdadeiras, pois, as etiopatogenias de cada uma delas são inteiramente diversas, assim como as condutas terapêuticas a serem adotadas<sup>5</sup>. Devemos assinalar que um mesmo paciente poderá ser portador de todas estas ocorrências necessitando portanto de um diagnóstico diferencial inequívoco.

Em **amostras clínicas recentemente emitidas** e dependendo da quantidade (até 5 hemácias por campo em média com Obj. 40x), o sedimento urinário evidenciará a presença de eritrócitos, porém as tiras reativas não detectam hemoglobina produzida por distúrbios hemolíticos, lise das hemácias no trato urinário<sup>1</sup> ou coleta inadequada, demora no transporte e processamento do material, possivelmente por falta de maior sensibilidade.

Com o objetivo de esclarecer dúvidas ocorridas com frequência na rotina do laboratório no que se refere à presença de sangue na urina, algumas informações serão descritas abaixo:

#### Hematúria sem hemoglobinúria

Em nossa casuística, ao longo de mais de duas décadas, com **urina recentemente coletada**, a hemoglobinúria não foi demonstrada pelas tiras reativas na presença de **até 10 hemácias bem preservadas** por campo em média, pois, em virtude da integridade da membrana, o conteúdo hemoglobínico está confinado no citoplasma do eritrócito.

Este quadro é característico de patologias que provocam hemorragias agudas e recentes tais como: cálculos renais, doenças glomerulares, pielonefrites, tumores, traumas, medicamentos (anticoagulantes, penicilinas, cefalosporinas, ciclofosfamida)

A hematúria sem hemoglobinúria também pode ser detectada em qualquer transtorno hematológico como leucemias, trombocitopenias, deficiência de fatores da coagulação, anemia falciforme e em pessoas saudáveis, após exposição a produtos químicos tóxicos e exercícios físicos intensos<sup>1,2,3</sup>.

A superfície rugosa de alguns tipos de cálculos renais causa lesão tissular pequena ou moderada, durante o trajeto através do sistema genitourinário, levando ao aparecimento de hemácias bem preservadas na urina. A formação e deposição de imunocomplexos, com a presença de anticorpos circulantes, causam efeitos deletérios na integridade da membrana glomerular liberando hemácias íntegras na urina<sup>6</sup>.

O uso de penicilinas e cefalosporinas pode originar quadros de nefrite intersticial aguda e cistite he-

morrágica, que se manifestam com hematúria<sup>7,8</sup>. Os eritrócitos presentes na urina devido a atividade física excessiva, cujo mecanismo ainda é desconhecido, são oriundos da bexiga<sup>3</sup>. Deve-se lembrar que a hematúria não patológica pode ser observada nos períodos inicial e final da menstruação.

Independentemente das contestações existentes, o exame do sedimento urinário é um auxiliar valioso no diagnóstico de diversas patologias. Trabalhos recentes demonstram que a identificação morfológica das hemácias tem grande importância na diferenciação das hematúrias do trato urinário.

Determinar o sítio do sangramento urinário tem sido um desafio para os médicos desde a antiguidade. Os primeiros estudos relacionados com o exame da morfologia dos eritrócitos foram descritos por Birch e Fairley<sup>9,10</sup>. Através da microscopia de contraste de fase foi possível diferenciar as hematúrias glomerulares das não-glomerulares com base no tamanho e na forma das hemácias.

Na hematúria glomerular as hemácias apresentam diversas anormalidades morfológicas e são denominadas **hemácias dismórficas**, fenômeno conhecido como **dismorfismo eritrocitário**. As hemácias dismórficas se caracterizam por possuir distorções, fragmentações e protusões da membrana. Sua presença decorre principalmente de sangramentos glomerulares. Por outro lado, as **hemácias eumórficas**, predominantes nas hemorragias não-glomerulares, uniformes em tamanho, são semelhantes às que normalmente existem na circulação sangüínea<sup>1,11</sup>.

#### Hemoglobinúria sem hematúria

A hemoglobinúria sem hematúria ocorre devido a existência de hemoglobina livre filtrada pelos glomérulos, resultante da **hemólise intravascular** ou quando os eritrócitos intactos entram na urina através do glomérulo e sofrem lise no trato urinário.

No entanto, é importante que o quadro acima descrito seja interpretado com segurança, vez que a hemoglobinúria sem hematúria pode ser observada sob dois aspectos:

#### Hemoglobinúria verdadeira

A reação positiva para hemoglobina, frequentemente encontrada na rotina do setor de uroanálise e evidenciada nas tiras reativas, não indica necessariamente que serão encontradas hemácias no sedimento urinário. A hemólise intravascular ocorre quando os eritrócitos normais são lesados por fixação do complemento às hemácias, injúrias mecânicas e fatores exógenos tóxicos, sendo o quadro que melhor caracteriza o achado supra descrito.

As principais causas da **verdadeira hemoglobinúria** incluem: anemias hemolíticas autoimunes e por fármacos, transfusões sangüíneas incompatíveis, infecções bacterianas e parasitárias, válvulas cardíacas artificiais, queimaduras graves e picadas de animais peçonhentos<sup>1,2</sup>.

Em condições normais, a filtração glomerular da hemoglobina não acontece em virtude da formação de complexos com a haptoglobina na corrente circulatória. Porém, quando a concentração de hemoglobina livre ultrapassa a da haptoglobina, parte daquela será eliminada na urina como ocorre nas situações acima referidas.

### **Falsa hemoglobinúria**

Podemos afirmar com segurança que a boa qualidade de qualquer material destinado à análise laboratorial é de fundamental importância para a obtenção de resultados confiáveis. A urina, particularmente em virtude de sua fragilidade físico-química, deve ser tratada com maiores cuidados, desde a coleta até a análise, no sentido de preservar os seus constituintes. Não esquecer que a importância clínica da análise laboratorial é tanto maior quanto mais bem preservados estiverem os componentes da amostra.

As principais causas do aparecimento de falsas hemoglobinúrias são: coleta do material (frascos inadequados e falta de instruções escritas ou verbais), demora no transporte do material enviado ao laboratório, no processamento (homogeneização e centrifugação), análise da amostra e contaminação menstrual. Além destas, podemos citar a presença de peroxidases de vegetais, enzimas bacterianas, urinas hipotônicas e agentes oxidantes no frasco coletor.

As alterações verificadas em urinas coletadas, armazenadas, transportadas, processadas e conseqüentemente analisadas erroneamente, são bastante conhecidas:

- a) aumento de pH, nitrito, bactérias, esterase leucocitária e turvação
- b) **desintegração de hemácias**, leucócitos, cilindros e alguns cristais
- c) diminuição de glicose, corpos cetônicos, bilirrubina e urobilinogênio, além da mudança na coloração<sup>1</sup>.

Casos de hemoglobinúria sem hematúria são detectados comumente em urinas cuja análise foi efetuada 2 horas após a coleta. As hemácias são hemolisadas liberando a hemoglobina livre para o meio, sugerindo falsa hemoglobinúria. Como a hipotonia urinária, isto é, densidade menor que 1,010, provoca também lise dos eritrócitos levando a uma falsa hemoglobinúria<sup>2</sup>, é aconselhável observar a gravidade específica da urina, preferencialmente através da refratometria, pois as tiras reativas medem este parâmetro em intervalos de 5 em 5 unidades, excluindo os valores intermediários. Entretanto, o aumento do pH urinário, em virtude da demora na realização do exame, é possivelmente a principal causa de hemólise<sup>2</sup> *in vitro*.

Embora a análise possa ser realizada em até duas horas, a literatura descreve que 30 minutos após a emissão da urina, já podem ser detectadas mudanças se algumas causas de deterioração do material não forem evitadas<sup>13</sup>:

- a) **Coleta do material**: frasco coletor impróprio (lavado com soluções oxidantes) e/ou falta de instruções

escritas ou verbais. Lembrar que muitos usuários levam de casa o material para o laboratório utilizando procedimentos de coleta e recipientes inadequados.

Recepcionistas de laboratório e médicos têm responsabilidade no que diz respeito às informações fornecidas ao cliente quanto ao modo correto de coletar a urina. A consulta é um bom momento para isto.

- b) **Demora no transporte da amostra enviada ao laboratório**, isto é, após 2 horas, que pode ser causada tanto pelo usuário como pelo próprio serviço de entrega. Imaginemos um laboratório que tem postos de coleta distantes da unidade central. Nestes casos, há necessidade de que este material seja obrigatoriamente mantido sob baixa temperatura com o objetivo de pelo menos diminuir os problemas causados pela falta de conservação até o momento de ser processado e analisado.

- c) **Demora no processamento e análise do material** – responsabilidade única e exclusiva do laboratório que deve priorizar estes procedimentos o mais rapidamente possível.

### **Mioglobinúria**

A mioglobina é uma proteína constituinte do grupo heme, encontrada nos tecidos musculares esquelético e cardíaco e serve como reserva no fornecimento de oxigênio para a musculatura<sup>12</sup>. A destruição, mesmo discreta, das fibras musculares, libera mioglobina para a circulação, sendo esta rapidamente eliminada do sangue e excretada pela urina.

A distinção entre hemoglobinúria e mioglobinúria é difícil de ser feita pelo exame da urina, pois, tanto a hemoglobina como a mioglobina reagem positivamente na área das tiras reativas destinada à pesquisa de sangue. Além do mais, como já foi mencionado, ambas produzem urina com tonalidade vermelha e aspecto límpido. Deve-se suspeitar da presença de mioglobina na urina de pacientes portadores de lesões musculares tais como: traumatismos, miopatias atroficas, insuficiência renal aguda (nefrotoxicidade), coma prolongado, convulsões repetidas, choque elétrico e exercícios físicos intensos.

O diagnóstico de mioglobinúria verdadeira baseia-se na história clínica do paciente (anamnese) e em alguns testes laboratoriais (provas sorológicas e sulfato de amônio). A observação cuidadosa da cor do plasma e da urina pode ser útil na diferenciação entre hemoglobinúria e mioglobinúria. Na hemoglobinúria, o plasma e a urina apresentam-se com tonalidade avermelhada ou vermelha, dependendo da gravidade do quadro, enquanto que na mioglobinúria a urina tem cor vermelha e o plasma assume a sua tonalidade normal.

É importante lembrar que a urina contaminada com soluções de iodo (ex: povidine) usadas como antissépticas em cirurgias, produzem reação falso-positiva para mioglobina em virtude das propriedades oxidantes deste produto químico. Lesões musculares causadas durante cirurgias podem aumentar a concentração sangüínea de mioglobina e conseqüente aparecimento de mioglobinúria<sup>1</sup>.

## Técnica para a detecção de mioglobina urinária

- 1) Centrifugar 10 mL de urina, previamente agitada, a 1.500 rpm durante 5 minutos.
- 2) Colocar 5 mL em um tubo de ensaio 16x100 mm e adicionar 2,8 g de Sulfato de Amônio pa.
- 3) Tampar o tubo, misturar por inversão e deixar em repouso durante 5 minutos.
- 4) Filtrar e utilizar o sobrenadante para a pesquisa de mioglobina.
- 5) Mergulhar rapidamente a tira reativa no filtrado (cerca de 1 segundo), eliminar o excesso de material encostando a aresta lateral da fita em papel higiênico, esperar o tempo recomendado pelo fabricante e proceder a leitura visual em ambiente com boa luminosidade ou automatizada.
- 6) A presença de mioglobina no sobrenadante provoca o aparecimento de reação positiva na área da tira reativa destinada à pesquisa de sangue. A hemoglobina é precipitada seletivamente pelo Sulfato de Amônio e retida no papel de filtração restando apenas mioglobina no filtrado.

### Interpretação da prova

**Mioglobinúria** – reação positiva após precipitação da hemoglobina.

**Hemoglobinúria** – reação negativa após precipitação da hemoglobina.

**Achados laboratoriais relacionados com hematúria, hemoglobinúria e mioglobinúria**<sup>1,2,3,14</sup>

#### Reações falso-negativas

- concentrações elevadas de Ácido Ascórbico
- níveis aumentados de nitrito
- intensa proteinúria
- densidade urinária elevada (crenação das hemácias)
- pH urinário inferior a 5 (inibição da hemólise)

#### Reações falso-positivas

- contaminação menstrual
- agentes químicos oxidantes (soluções de iodo, hipoclorito)
- peroxidases bacterianas e de vegetais
- urinas hipotônicas

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Strasinger, S. K.** *Uroanálise & Fluidos Biológicos*, Editorial Premier, 3ª Edição, pp 65-67, 2000.
2. **Henry, J. B.** *Diagnósticos Clínicos & Tratamento por Métodos Laboratoriais*, Editora Manole Ltda, 18ª Edição, pp 443-514, 1995.
3. **Graff, S. L.** *Análise de Orina Atlas Color*, Editorial Medica Panamericana, 1ª Edição, pp 49-54, 1987.
4. **Queiroz, M. G. R.; Alencar, N. M. N.; Melo, C. L.** Proposta de um modelo de padronização para o exame sumário de urina. *RBAC*, 32(4): 243-247, 2000.
5. **Medeiros, A. S.** *Semiologia do Exame Sumário de Urina*. Editora Guanabara Koogan, p 47, 1981.
6. **McBride, L. J.** *Textbook of Urinalysis and Body Fluids*. Lippincott, pp 140-141, 1997.
7. **Chudwin, D. S.; Chesney, P. J.; Mischler, E. H.; Chesney, R. W.** Hematuria associated with carbenicillin and other semisynthetic penicillins. *Am. J. Dis. Child.* 133:98-99, 1979.
8. **James, J. A.** Proteinuria and hematuria in children: diagnosis and assessment. *Pediatr. Clin. North Am.* 23:807-816, 1976.
9. **Birch, D. F.; Fairley, K. F.** Hematuria: Glomerular or nonglomerular? *Lancet* 2:845-846, 1979.
10. **Fairley, K. F.; Birch, D. F.** Hematuria: A simple method for identifying glomerular bleeding. *Kidney Int.* 21:105-108, 1982.
11. **Stapleton, F. B.** Morphology of Urinary Red Blood Cells: A Simple Guide in Localizing the Site of Hematuria. *Pediatric Nephrology* 34(3):561-569, 1987.
12. **Stryer, L.** *Biochemistry*. San Francisco: W. H. Freeman and Co, 1975.
13. **Urinalysis and Collection, Transportation, and Preservation of Urine Specimens; Approved Guideline.** *National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)*, GP 16-A Vol. 15, Nº 15, Replaces GP 16-T, Vol. 12, Nº 26, 1995.
14. **Levin, K.; Engstrom, J.** Inadequate hemolysis of erythrocytes on reagent strips at low pH causes false-negative readings. *Clin. Chem.* 30(11):1845-1847, 1984.

Endereço para correspondência

Prof. Celio Lima de Melo

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – DACT

Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – FFOE

Universidade Federal do Ceará – UFC

Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo, 60.430-370 - Fortaleza - CE

E-mail: clime@uol.com.br

## TEMAS LIVRES

### Prêmio PNCQ

Categoria: “Melhor trabalho em Controle de Qualidade”

Valor equivalente a US\$ 1.500,00

Será concedido um prêmio aos trabalhos apresentados e selecionados na sessão de Temas Livres dos congressos promovidos pela Sociedade Brasileira de Análises Clínicas.

A premiação será feita na sessão de abertura, com a entrega do diploma.

O trabalho vencedor desse prêmio poderá fazer parte da programação oficial do Congresso.

Para concorrer ao prêmio, os interessados devem solicitar as informações necessárias à

**Sociedade Brasileira de Análises Clínicas**

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

Tel (0xx21)2264-4449 • Fax (0xx21)2234-4881

e-mail: informacao.cong@sbac.org.br.

# Estudos hematológicos e bioquímicos em *Rattus norvegicus* (Wistar) submetidos à ação do veneno de *Dirphia* sp.\*

Hematological and biochemical studies in *Rattus norvegicus* (Wistar) submitted to the *Dirphia* sp. (Lepidoptera, Saturniidae) venom

T. A. Castaman<sup>1</sup>; A. Lunardelli<sup>2</sup>; R. C. V. Santos<sup>3</sup>; M. Assis<sup>4</sup>; R. N. Moresco<sup>5</sup> & J. R. Oliveira<sup>6</sup>

**RESUMO** – As taturanas do gênero *Dirphia* provocam acidentes que vão desde simples irritações na pele à queimaduras graves e até reações alérgicas. Neste desígnio, o intento foi estudar alguns parâmetros hematológicos e bioquímicos de animais submetidos à ação do veneno de *Dirphia* sp., para aprofundar os conhecimentos da biologia do inseto possibilitando um auxílio mais adequado ao tratamento das vítimas expostas ao veneno deste saturnídeo. Para tanto, se fez uso de ensaios toxicológicos agudos, administrando-se intraperitonealmente aos ratos o extrato das cerdas de *Dirphia* sp. O sangue dos sobreviventes foi coletado para análises hematológicas e bioquímicas. Os resultados revelaram que o veneno de *Dirphia* sp. provoca dano renal e hepático, aumento dos níveis sanguíneos de creatinina, ALT (TGP), neutrófilos (totais, segmentados e em bastão) e queda dos valores de albumina e linfócitos. Provoca ainda alterações no hematócrito e leucócitos de alguns grupos de animais. É achado também, um grande volume de líquido na cavidade peritoneal dos animais experimentais.

**PALAVRAS-CHAVE** – *Dirphia* sp., lepidópteros, venenos animais, bioquímica, hematologia.

**SUMMARY** – The caterpillars of the genus *Dirphia* promote accidents that go from simple irritations in the skin to serious burns and even allergic reactions. In this design, the project was to study some hematological and biochemical parameters from animals who was submitted to the action of the poison of *Dirphia* sp., for deepen the knowledge of the biology of that insect, making possible a more appropriate aid to the treatment of the victims of this saturniid. For so much, it was made use of sharp toxicological rehearsals; being administered the extract of the bristles of *Dirphia* sp. into the rat's peritoneum cavity. The survivors' blood was collected for hematological and biochemical analysis. The results revealed that the poison of *Dirphia* sp. provoke renal and hepatic damage, increase the blood levels of creatinine, ALT/GTP, neutrophils and fall of the albumin values and lymphocytes. It still induces alterations in the hematocrit and leukocytes of some experimental groups. It is also found a great liquid volume in the peritoneum.

**KEYWORDS** – *Dirphia* sp., lepidoptera, animal venom, biochemistry, hematology.

## INTRODUÇÃO

Em todos os níveis da escala filogenética animal, encontramos vários exemplos de ataque, defesa e outros comportamentos que dependem de substâncias repelentes, paralisantes ou com outras ações biológicas. Durante os milhões de anos de evolução, os animais desenvolveram um refinamento dessas substâncias para diversas funções, tais como a captura de presas e as defesas químicas em geral<sup>4</sup>. As toxinas empregadas pelos organismos na defesa química podem afetar outros indivíduos através da dieta ou da inoculação por meio de estruturas especializadas<sup>6</sup>.

Os lepidópteros dos gêneros *Automeris*, *Dirphia*, *Lonomia* (família Saturniidae) podem causar acidentes

quando manuseados, que variam de reações leves até queimaduras graves e reações alérgicas profundas<sup>1,10</sup>. Os acidentes acontecem quando o inseto ainda encontra-se na fase larval, ou imatura, quando é denominado "lagarta", também conhecida popularmente como "taturana", "mandarovás" e "bicho-cabeludo", ocasião em que as cerdas pontiagudas e ocas entram em contato com a pele humana, fazendo com que o veneno contido na base dos "espinhos" ou cerdas seja injetado no indivíduo<sup>1,12,14</sup>.

Taxas crescentes de aumento populacional desses insetos, porém, podem ocorrer devido à alguns fatores que favorecem sua proliferação de maneira acentuada, tais como a farta oferta de alimento, a diminuição de predadores naturais e condições ambientais favoráveis, dentre outros.

Recebido em 27/7/2001

Aprovado em 6/8/2001

\*Trabalho desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Faculdade de Biociências, PUCRS - CNPq - Dissertação de Mestrado  
Biólogo, Mestre em Biociências, PUCRS - Autor Principal; <sup>2,3,4</sup>Alunos do Curso de Graduação em Farmácia - Análises Clínicas, PUCRS

<sup>5</sup>Farmacêutico Bioquímico, Aluno do Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica - HCPA, UFRGS

<sup>6</sup>Professor Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Biofísica, Faculdade de Biociências, PUCRS

Em 1954, foi descrita uma atividade da toxina de *Dirphia* sp. possivelmente semelhante à ação da histamina, provocando vasodilatação acompanhada de queda brusca da pressão sangüínea dos animais<sup>15</sup>. A literatura, entretanto, não apresenta maiores esclarecimentos acerca deste animal e sua toxina.

Tendo em vista o fato de os estudos relacionados aos mecanismos de lesão do veneno de *Dirphia* sp. não serem encontrados abundantemente na literatura científica e levando-se em conta a similaridade desta espécie com as aquelas citadas anteriormente, há a possibilidade de alguns dos acidentes ocorridos com lagartas não terem sido provocados por *Lonomia* e sim por *Dirphia*.

Poucos destes acidentes têm sido relacionados com a última mencionada, levando este gênero ao errôneo desprezo clínico. Assim, o conhecimento dos efeitos bioquímicos e hematológicos do veneno de *Dirphia*, juntamente com a adição de maiores informações a respeito de sua toxicidade poderão contribuir na prevenção e tratamento de acidentes, danos causados à população, bem como no desenvolvimento de novas pesquisas na área da toxicologia animal.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Métodos

O trabalho foi realizado com *Rattus norvegicus* (Wistar) de laboratório, machos adultos, pesando entre 220g e 250g, todos de mesma linhagem e socialização.

Foi feito um extrato da toxina dos exemplares de *Dirphia* sp, que consistiu na extração das cerdas das lagartas, desprezando qualquer porção de tecido. O produto foi homogenizado em tampão PBS pH 7,4, centrifugado a 2100g por 10 minutos e mantido congelado a -20°C até a sua utilização. A concentração protéica foi avaliada pelo método turbidimétrico através do uso de TCA 3%.

Para o estudo foram usados grupos de 12 animais (D1, D2 e D3) nos quais foi aplicado o veneno em três diferentes concentrações. Fez-se uso de ensaios toxicológicos agudos, administrados intraperitonealmente. As concentrações de ECD utilizadas nos grupos foram as seguintes:

D1 - 0,100mg proteína/kg;

D2 - 0,181mg proteína/kg;

D3 - 0,387 mg proteína/kg.

Cada concentração provocou a morte dos animais do grupo em percentuais diferentes:

D1 - 4 animais mortos (33%);

D2 - 6 animais mortos (50%);

D3 - 10 animais mortos (83%).

Foram experimentados animais controle que forneceram os padrões hematológicos e bioquímicos. A este grupo administrou-se somente tampão PBS pH 7,4.

Após 12 horas da inoculação da toxina nos animais, fez-se a coleta de sangue por punção retro-ocular. As amostras para os ensaios bioquímicos foram obtidas a partir do soro dos animais. Para a hematologia e cálculo de atividade de protrombina as amostras foram armazenadas em frascos com anticoagulante (EDTA e citrato de sódio, respectivamente).

As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do software SPSS for Windows versão 9.0.1.

## MATERIAIS

Para o cálculo da atividade de protrombina, foi utilizada a técnica de Quick (tromboplastina cálcica anti-heparina - Biolab). Para as dosagens de creatinina, utilizou-se o método de Jaffé Labtest Diagnóstica. As dosagens de albumina foram determinadas pelo ensaio de ponto final (verde de bromo cresol) Liquiform Labtest Diagnóstica. Para as transaminases - Alanina Aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST) - foram utilizados ensaios cinéticos em ultravioleta Liquiform Labtest Diagnóstica. As leituras foram feitas em espectrofotômetro Genesys 8 (Spectronic Instruments).

A contagem de leucócitos foi feita em câmara de Neubauer e o diferencial com esfregaço de sangue em lâminas coradas com May-Grünwald-Giemsa. Para a análise deste material utilizou-se microscópio Olympus (CH2 e CH30). Determinação de hematócrito com capilar em micro-hematócrito em centrífuga Biofuge Haemo (Heraeus Instruments). A concentração de hemoglobina foi determinada pelo método de cianometahemoglobina Labtest Diagnóstica.

## RESULTADOS

### Análise bioquímica

Foi observada uma queda significativa dos valores de albumina do grupo D1 em relação ao grupo controle, o que pode ser visto na Fig. 1.

Os valores encontrados nas dosagens de aspartato aminotransferase (AST) não apresentaram diferenças significativas quando comparados ao grupo controle. Observou-se, entretanto, um aumento significativo nos níveis de alanina aminotransferase (ALT) no grupo D1 em relação ao grupo controle (Fig. 2). Este grupo apresentou ainda, aumento significativo nos níveis de creatinina, o que também ocorreu com o grupo D2 (Fig 3).

### Análise hematológica

Os leucócitos apresentam um aumento significativo no grupo D3 e uma diminuição, também significativa, no grupo D1 (Fig. 4). Quanto aos linfócitos, os grupos D1 e D3 apresentaram uma diminuição significativa quando relacionados ao grupo controle (Fig. 5).

Com relação aos neutrófilos totais, mostrados na Fig. 6, observamos um aumento significativo apenas no grupo D3.

Os neutrófilos segmentados (Fig. 7) apresentaram-se diferenciados por um aumento no grupo D1 e os neutrófilos em bastão (Fig. 8), com aumentos significativos nos grupos D1 e D3, são apresentados a seguir.

Os parâmetros eosinófilos e basófilos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre o grupo controle e os grupos experimentais.

Os resultados referentes ao hematócrito nos permitem observar um aumento significativo nos valores do grupo D1 (Fig. 9).

A Tabela I mostra os Tempos de Protrombina (TP) obtidos na análise do plasma dos animais. Nota-se uma diminuição do TP dos animais dos grupos experimentais em relação ao grupo controle. Esta diminuição tem significância nos grupos, D1 e D2.

### Líquido Peritoneal (LP)

Constatamos que os animais que evoluíram a óbi-

to, apresentaram um aumento significativo de volume do LP. Na Tabela II mostramos a relação entre as doses administradas, o volume de LP observado, concentração e quantidade de albumina.

Uma análise de correlação serve para determinar se dois conjuntos de dados se relacionam, isto é, se os maiores valores de um conjunto estão associados com os maiores valores do outro (correlação positiva), se os menores valores de um conjunto estão associados com os maiores valores do outro (correlação negativa), ou se os valores dos dois conjuntos não se relacionam (correlação próxima a zero).

A análise de correlação entre a concentração protéica de ECD administrada e o volume de LP encontrada ( $R^2 = 0,014$ ), permite-nos concluir haver correlação próxima a zero, ou seja, há pouca correlação entre os dois parâmetros. Os dados referentes ao volume de LP e à dose de ECD administrada são mostrados na Fig. 10.

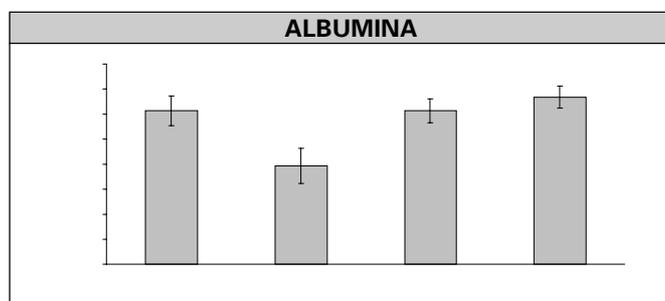


Figura 1 - Média e desvio-padrão da concentração de albumina encontrada no plasma dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

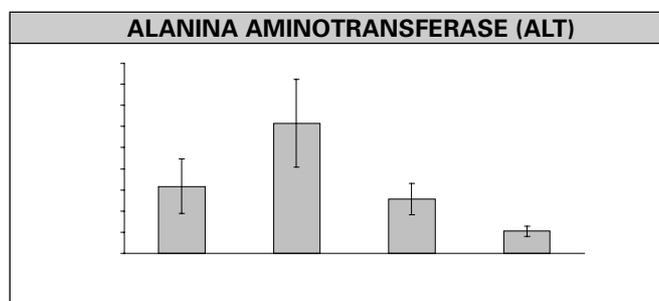


Figura 2 - Média e desvio-padrão da atividade de alanina aminotransferase (ALT) encontrada no plasma dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

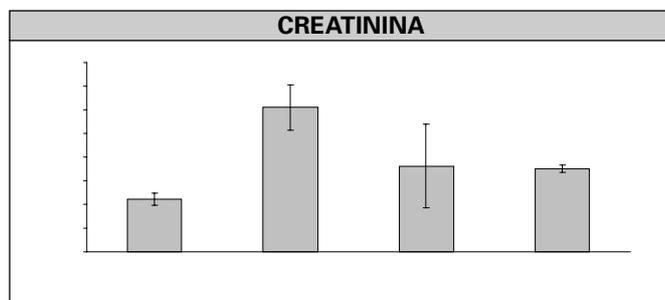


Figura 3 - Média e desvio-padrão da concentração de creatinina encontrada no plasma dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

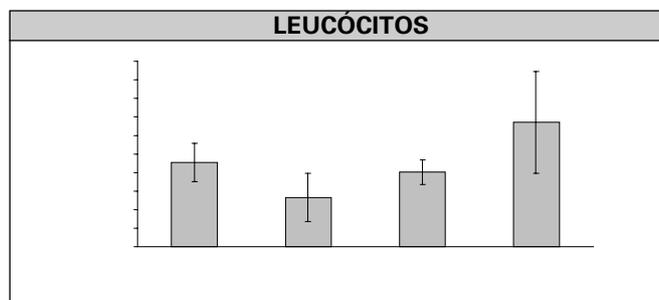


Figura 4 - Média e desvio-padrão da porcentagem de leucócitos encontrados no sangue dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

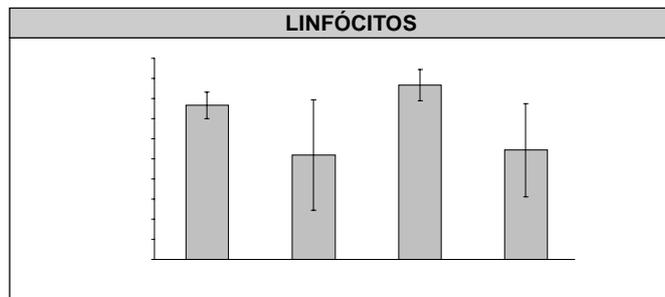


Figura 5 - Média e desvio-padrão da porcentagem de linfócitos encontrados no sangue dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

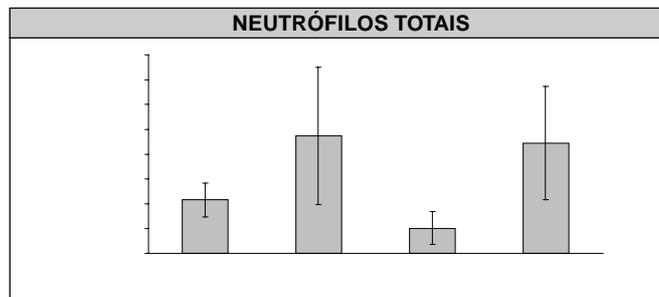


Figura 6 - Média e desvio-padrão da porcentagem de neutrófilos totais encontrados no sangue dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

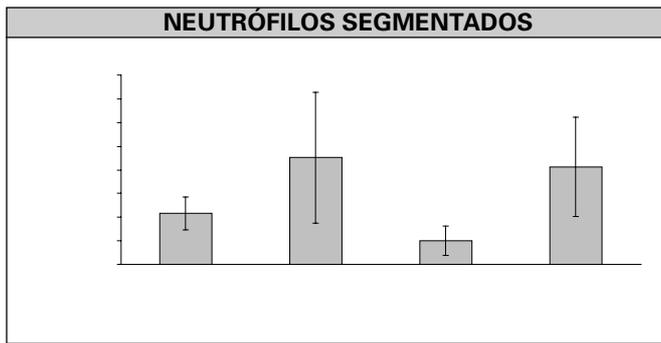


Figura 7 - Média e desvio-padrão da percentagem de neutrófilos segmentados encontrados no sangue dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

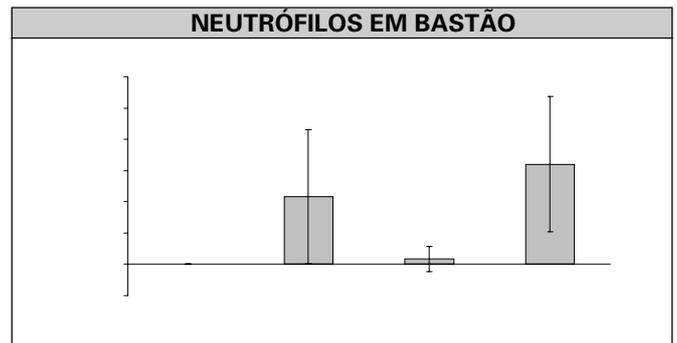


Figura 8 - Média e desvio-padrão da percentagem de neutrófilos em bastão encontrados no sangue dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

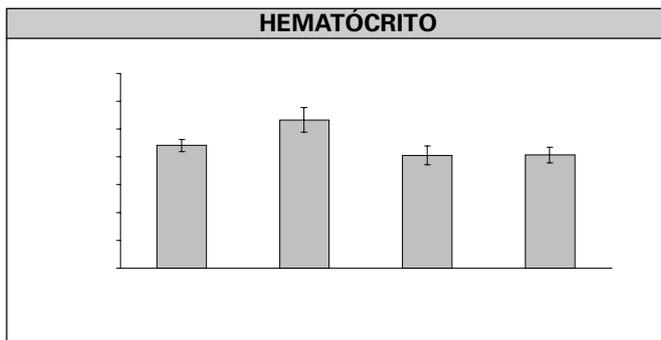


Figura 9 - Média e desvio-padrão da percentagem de hematócrito encontrados no sangue dos grupos experimentais. As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) entre o grupo controle e os demais grupos estão indicadas por \*.

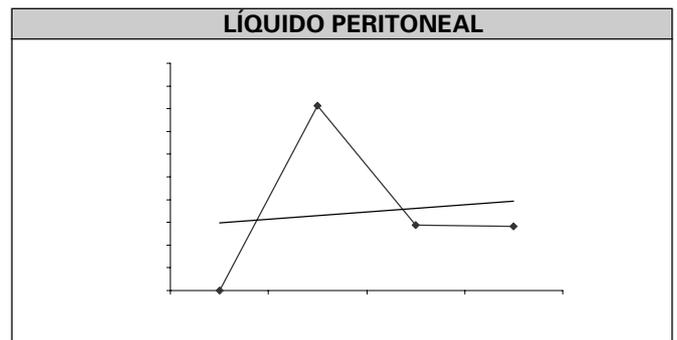


Figura 10 - Média do volume de Líquido Peritoneal (LP) encontrado nos animais mortos.

**TABELA I**

Relação entre as diferentes doses de ECD administradas e a média do Tempo de Protrombina (TP) dos animais experimentais e controle

Grupo	TP (segundos)
Controle	19,29 *
D1	15,12 *
D2	15,93 *
D3	18,12 *

As diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) estão representadas por \*.

**TABELA II**

Relação entre as diferentes doses de ECD administradas, a média do volume de LP encontrado nos animais mortos, da concentração e da quantidade de albumina presente no LP

Grupo	n	Volume LP (mL)	Albumina (g/dL)	Albumina (total no LP, em mg)
D1	2	6,50 ± 1,41	2,10	136
D2	6	2,30 ± 1,32	3,14	72
D3	2	2,25 ± 0,35	2,63	59

## DISCUSSÃO

Os dados existentes na literatura sobre lepidópteros com importância toxicológica mencionam efeitos hemorrágicos nas vítimas em casos de contato maciço, o que nos levou à busca de um quadro clínico característico semelhante para a ação do veneno de *Dirphia* sp<sup>4</sup>. Os resultados encontrados não apresentam porém, evidências macroscópicas de hemorragia, não sendo esta portanto, a causa da morte dos animais.

A constatação da ausência de hemorragia também se verifica através da análise dos tempos de protrombina dos animais experimentados. Os grupos que receberam doses de ECD apresentaram TP inferior ao controle, o que comprova que a toxina não é hemorrágica.

Observa-se aumento significativo dos níveis de creatinina nos grupos D1 e D2, indicando provável dano renal (confirmado posteriormente pela análise histológica). A constância da formação e da excreção da creatinina torna-se num útil indicador do estado da função renal, principalmente da filtração glomerular<sup>3,4,7</sup>. A creatinina plasmática tem tendência a aumentar nas doenças renais<sup>7</sup>.

A análise sobre o parâmetro albumina mostra uma significativa queda dos níveis no grupo D1. Embora uma provável lesão do fígado (órgão responsável pela síntese desta que é a proteína sérica mais importante quantitativamente) possa contribuir para a diminuição da albumina<sup>11</sup>, esta queda não é significativa em lesão hepática aguda ou leve, já que a albumina tem uma meia-vida plasmática de 14 a 20 dias, com uma

renovação de menos de 5% ao dia<sup>9</sup>. A queda da concentração de albumina no plasma pode ser justificada por perda por lesão renal ou por passagem da proteína para o terceiro espaço, em consequência do aumento da permeabilidade vascular, o que pode ser comprovado pela maior concentração de albumina no LP grupo D1 (Tabela II).

A dosagem de alanina aminotransferase (ALT/TGP), que mostrou-se elevada no grupo D1, é indicadora de lesão hepatocelular. Este aumento está relacionado com lesão hepática. A ALT sérica está elevada em certa extensão em quase todas as doenças do fígado<sup>9</sup>.

A AST é uma enzima que encontra-se em alta concentração no fígado, presente no citosol e dentro das mitocôndrias. A ALT também existe em grande concentração na célula hepática, porém é exclusivamente citosólica. Em nosso estudo não verificamos aumento da AST, entretanto, detectamos um aumento significativo dos níveis de atividade plasmática de ALT, indicando não haver expressiva necrose celular<sup>11,13</sup>. Ocorre, porém, um dano na membrana celular de maneira a permitir o extravasamento do conteúdo citosólico (ALT) destas células<sup>13</sup>.

A análise dos leucócitos do sangue dos animais sobreviventes mostrou-nos um aumento percentual dos leucócitos no grupo D3. A leucocitose ocorre em resultado de uma doença, geralmente constitui uma resposta às lesões dos tecidos e é, na maior parte das vezes, uma neutrofilia<sup>7</sup>, com o aumento dos neutrófilos segmentados e/ou em bastão.

Em nosso estudo, a leucocitose verificada no grupo D3 se deve a um aumento significativo dos neutrófilos em bastão e por um aumento, porém não significativo, das formas segmentadas. Estas alterações são características das reações de hipersensibilidade e intoxicações, além de envenenamentos por picadas de insetos ou ofídios, que formam a neutrocitose proporcional à gravidade sistêmica das manifestações locais<sup>2,5</sup>. Provavelmente, a leucocitose que aparece apenas no grupo D3 seja ocasionada pela alta dosagem da toxina.

No grupo D1 constatamos aumento de neutrófilos em bastão e segmentados. Estes resultados podem ser consequência da hipersensibilidade provocada pelo veneno, como foi discutido acima.

O aumento dos leucócitos ocorrido no grupo D3 é acompanhado por uma queda no número de linfócitos. Não é correto porém, interpretar como linfocitopenia o baixo percentual dos linfócitos quando há leucocitose às expensas de outro tipo celular: esta é uma linfocitopenia apenas relativa, não real<sup>2</sup>. A linfocitopenia acontecida no grupo D1 provavelmente decorre da leucopenia apresentada no mesmo grupo, uma vez que pode acontecer em quadros de lesões renais ou Insuficiência Renal Aguda<sup>1</sup>, que neste grupo são evidenciadas pelo aumento dos níveis plasmáticos de creatinina.

Analisando o hematócrito, nota-se aumento significativo nos valores do grupo D1. Este aumento, que contrasta com o grupo controle, é uma falsa eritrocitose, pois pode derivar de uma diminuição isolada do volume plasmático<sup>10</sup>. Em nosso estudo, a causa clara da hipovolemia provém da quantidade de líquido peritoneal encontrado nos grupos experimentais. A maior quantidade de eritrócitos evidenciada pelo hematócrito é justificada pelo líquido peritoneal encontrado em maior volume no grupo em questão.

Os efeitos bioquímicos da toxina provocam, nos roedores, aumento nas taxas de creatinina e ALT além do decréscimo da concentração de albumina plasmática.

Análises hematológicas revelam alterações no hematócrito e contagem de leucócitos, aumento de monócitos, neutrófilos e queda dos níveis de linfócitos e no tempo de protrombina.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Alvarenga, Z.** A taturana. In: Ver. Fac. Med. USP, Ann. Congr. Bras. Med. Cir. Belo Horizonte, 1912. V. II. P. 132-135.
2. **Bain, B. J.** *Células sangüíneas: um guia prático*. 2ª ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 1997. 334 p.; il.
3. **Burdmann, E. A., Antunes, I. Saldanha, L. B. Abdulkader, R. C.** Severe acute renal failure induced by the venom of *Lonomia* caterpillars. *Clinical Nephrology*, 1996. 46 (5): 337-39.
4. **Duarte, A., et al.** Insuficiência renal aguda por acidente com lagartas. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*. 1990. 12: 184-187.
5. **Failace, R.** *Hemograma: manual de interpretação*. 3ª ed. Porto Alegre, Artes Médicas, 1995. 198 p.
6. **Freitas, J. C.** Veneno e peçonha. In: **Nicolella, E. A.; Barros, E.; Torres, J. B.; Marques, M. G.** *Acidentes com animais peçonhentos. Consulta rápida*. Porto Alegre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 1997. p. 31.
7. **Henry, J. B.** *Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais*. 16ª ed. São Paulo, Manole, 1982. 2 v.
8. **Ikedo, H., Kobayashi, K.** Pathophysiologic changes in patients with severe burns: role of hormones and chemical mediators. *Trauma and Critical Care Center*, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan. 1998. 99 (1): 2-7.
9. **Isselbacher, K. J., Braunwald, E., Wilson, J. D., Martin, J. B., Fauci, A. S., Kasper, D. L.** *Harrison: Medicina interna*. 13ª ed. Rio de Janeiro, McGraw-Hill, 1995. 2 v.; il.
10. **Lima, A. M.**, *Insetos do Brasil: Lepidópteros*. Rio de Janeiro, Escola Nacional de Agronomia, 1945. v. 5, VII + 379p.
11. **McCance, K. L., Huether, S.** *Pathophysiology: the biologic basis for diseases in adult and children*. 2nd ed. St Louis, Missouri, Mosby - Year Book, Inc, 1994.
12. **Nicolella, A.; Barros, E.; Torres, J. B.; Marques, M. G.** *Acidentes com animais peçonhentos. Consulta rápida*. Porto Alegre, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 1997. 207p.
13. **Robbins, S. L.** *Patologia estrutural e funcional*. Rio de Janeiro, Interamericana, 1975.
14. **Schvartsman, S.** *Plantas venenosas e animais peçonhentos*. São Paulo, Sarvier, 1992. 288p.
15. **Valle, J. R., Picarelli, Z. P., Prado, J. L.** Histamine content and pharmacological properties of crude extracts from setae of urticating caterpillars. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1954, XCVIII, nº 3 pp. 324-334.

Endereço para correspondência:

Professor Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira  
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Biociências - Laboratório de Pesquisa em Biofísica  
Av. Ipiranga, 6681, Pd 12A, Caixa Postal 1429  
90619-900 - Porto Alegre - RS - Brasil

# As moléculas de adesão e a patogênese das doenças reumáticas sistêmicas\*

## The adhesion molecules and the pathogenesis of systemic rheumatic diseases

Carolina Ferruffino<sup>1</sup>, Shirley Rosa Utiyama<sup>2</sup> & Sérgio S. Siqueira<sup>3</sup>

**RESUMO** – O processo inflamatório é caracterizado pelo acúmulo de leucócitos e outras células nos locais onde ocorre injúria e infecção. As moléculas de adesão desempenham papel importante nos processos inflamatórios. São expressas no endotélio vascular e nas células leucocitárias, e permitem a passagem e conseqüente migração dos leucócitos ao sítio de infecção. São elas: integrinas, selectinas e superfamília das imunoglobulinas. A Artrite Reumatóide, o Lupus Eritematoso Sistêmico e a Esclerodermia são doenças reumáticas relacionadas a uma contínua produção de auto anticorpos contra antígenos do próprio organismo. Drogas anti-inflamatórias e terapias com anticorpos monoclonais vêm sendo usadas e testadas em pacientes portadores dessas doenças, afim de reduzir ou inibir a expressão de algumas moléculas de adesão. Em vários casos observou-se uma melhora clínica do paciente.

**PALAVRAS-CHAVE** – Moléculas de adesão, integrinas, selectinas, superfamília das imunoglobulinas.

**SUMMARY** – The inflammatory process is characterized by accumulation of leucocytes and other cells in the sites of injury and infection. During this process, leucocytes and plasmatic cells are attracted to these sites or to damaged tissues. Adhesion molecules play an important role into inflammatory processes. They are expressed by vascular endothelium and leucocitary cells, allowing leucocytes passage and migration to the sites of infection. The adhesion molecules are; Integrins, Selectins and Immunoglobulin Superfamily. Rheumatoid Arthritis, Systemic Lupus Erythematosus and Scleroderma are rheumatic diseases related to a continuous production of auto-antibodies. Anti-inflammatory drugs and therapies with monoclonal antibodies have been used and tested in patients with these diseases, in order to reduce or inhibit the expression of some adhesion molecules. Patient's clinical improvement was observed in several cases.

**KEYWORDS** – Adhesion molecules, integrins, selectins, immunoglobulin superfamily.

### INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é caracterizado pelo acúmulo de leucócitos e outras células nos locais onde ocorre injúria e infecção. Durante esse processo, leucócitos e moléculas plasmáticas são atraídos para o sítio de infecção ou tecido lesado. Os principais efeitos são um aumento na permeabilidade vascular, permitindo a exsudação de proteínas séricas, como anticorpos e complemento, importantes para o controle da infecção e uma maior migração de leucócitos através do endotélio vascular e na direção do sítio de inflamação. Quando a inflamação resulta da invasão de um microrganismo, a resposta inflamatória tem o propósito de localizar, destruir e eliminar o organismo invasor. Entretanto, na ausência de um microrganismo identificável, essa resposta pode persistir e ser tão prejudicial ao hospedeiro quanto o próprio invasor (Cronstein e Weissmann 1993; Roitt 1996).

As moléculas de adesão desempenham importante papel nos processos inflamatórios. São expressas no endotélio vascular e nas células leucocitárias, e permitem a passagem e conseqüente migração dos leucócitos ao sítio de infecção (Figuras 1 e 2). Isto ocorre em duas etapas: a primeira é a fixação das células circulantes ao endotélio vascular, seguida da penetração das mesmas através das células endoteliais. No segundo estágio, após atravessarem o endotélio, as células migram em direção ao sítio inflamatório, sob a orientação de estímulos quimiotáticos. Vários tipos de moléculas de adesão estão envolvidos na resposta imune, sendo as mais importantes as moléculas de adesão celular (CAMs), pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, as integrinas e as selectinas. As CAMs são expressas principalmente no endotélio vascular e dividem-se em ICAM-1 (CAM-1 intercelular), ICAM-2, VCAM (CAM-1 vascular) e MadCAM-1 (CAM-1 de adesão mucosal). As integrinas são o maior grupo de

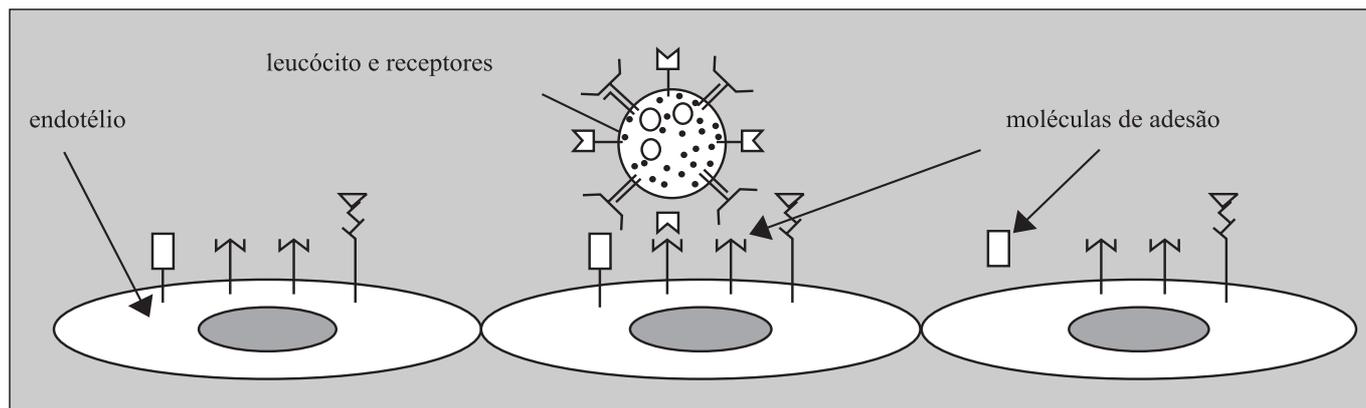
Recebido em 8/8/2001  
Aprovado em 15/8/2001

\*Trabalho derivado da Monografia apresentada para obtenção do título de Especialista ao Curso de Pós-graduação em Análises Clínicas com ênfase na interdisciplinaridade, Pontifícia Universidade Católica do Paraná

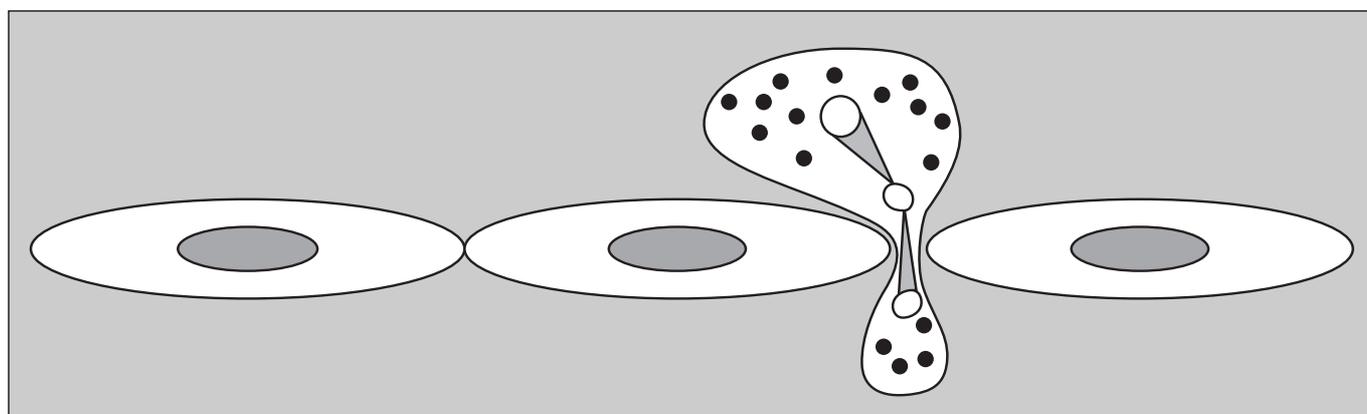
<sup>1</sup>Farmacêutica Bioquímica, Curitiba, PR; <sup>2</sup>Professora do Departamento de Patologia Médica da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR

<sup>3</sup>Professor do Curso de Farmácia e Bioquímica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, PR

**FIGURA 1**  
Interação do leucócito com o endotélio vascular através das moléculas de adesão



**FIGURA 2**  
Passagem do leucócito através do endotélio. Fonte: Abbas, 1997



moléculas de adesão, presentes em muitas células inclusive leucócitos. Dividem-se em 3 subfamílias principais, dependendo da presença de cadeias  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  e  $\beta 3$ . As  $\beta 1$ -integrinas estão envolvidas na ligação de células à matriz extracelular, as  $\beta 2$ -integrinas unem leucócitos ao endotélio e a outras células imunes e as  $\beta 3$ -integrinas estão envolvidas na interação de plaquetas e neutrófilos em sítios inflamatórios. Cada cadeia  $\beta$  pode associar-se a uma das várias cadeias  $\alpha$ , dando origem a diferentes moléculas. As selectinas interagem com moléculas de carboidrato presentes na superfície de leucócitos e células endoteliais e incluem a E-selectina, expressa no endotélio, a P-selectina, expressa no endotélio e plaquetas, e a L-selectina, expressa em alguns leucócitos (Kuby 1994; Sfikakis e Tsokos, 1995; Roitt, 1996; Abbas *et al* 1997).

Certas doenças auto-imunes como a Artrite Reumatóide, o Lupus Eritematoso Sistêmico e a Esclerodermia, são patologias relacionadas a uma contínua produção de auto-anticorpos contra antígenos do próprio organismo, levando a uma prolongada produção de imunocomplexos. Algumas drogas anti-inflamatórias vêm sendo usadas em pacientes portadores de doenças reumáticas a fim de reduzir ou inibir a expressão de certas moléculas de adesão.

Além disso, sabe-se que a indústria farmacêutica está desenvolvendo novas drogas anti-adesivas, entre elas a produção de anticorpos monoclonais dirigidos contra moléculas de adesão no endotélio, leucócitos e outros tipos de células (Cronstein e Weissmann, 1993; Mojciak e Shevach, 1997; Scrofernecker e Pohlmann, 1998).

O presente estudo tem como objetivo caracterizar a função das moléculas de adesão bem como determinar a participação dessas moléculas nas principais doenças reumáticas, relatando possíveis tratamentos para tais patologias.

### As moléculas de adesão

Durante as reações inflamatórias, cada população de células possui uma diferente via de migração:

- Os fagócitos, incluindo neutrófilos e monócitos, deixam a medula óssea e migram para os tecidos periféricos, especificamente aos sítios de infecção. Neutrófilos migram apenas nessa direção, mas os monócitos diferenciam-se em macrófagos e podem circular nos tecidos linfóides secundários para agirem como células apresentadoras de antígenos (CAAs).

- Os linfócitos migram do timo e medula óssea para os tecidos linfóides secundários, como baço e linfonodos. Após ativação pelo antígeno, células T ativadas migram ao sítio de infecção, enquanto células B e células T de memória procuram outros tecidos linfóides.
- As células dendríticas são originalmente derivadas das células tronco da medula óssea, as quais colonizam vários órgãos e podem migrar para os linfonodos locais para apresentar antígenos para linfócitos T CD4+ (Cronstein e Weissmann, 1993; Roitt, 1996; Sfikakis e Mavrikakis, 1999).

A migração dessas células a partir da corrente sanguínea depende da expressão de moléculas de adesão no endotélio vascular e nas próprias células, e de seus receptores; o endotélio expressa moléculas de adesão as quais são reconhecidas pelos seus receptores em linfócitos ativados, ou fagócitos que direcionam o tráfico de células para as áreas de infecção. A migração dos leucócitos é controlada pelas moléculas de adesão tanto no endotélio como nos leucócitos, pela capacidade migratória dos leucócitos e pela presença de agentes quimiotáticos (Lachmann *et al*, 1993; Kuby, 1994; Roitt, 1996).

As moléculas de adesão intercelular são proteínas de membrana ligantes que permitem a interação de uma célula com outra. Normalmente estas moléculas atravessam a membrana e estão ligadas ao citoesqueleto da célula. Há duas maneiras pelas quais as células podem alterar o nível de expressão das moléculas de adesão: muitas células contêm depósitos de moléculas de adesão, as quais podem rapidamente deslocar-se para a superfície e, células endoteliais em sítios de inflamação podem sintetizar novas moléculas, o que geralmente leva várias horas (Kuby, 1994; Roitt, 1996).

### Integrinas

Contém pelo menos 15 cadeias  $\alpha$  e 8 cadeias  $\beta$  que se combinam para formar heterodímeros, que consistem de uma cadeia  $\alpha$  ligada covalentemente a uma cadeia  $\beta$ . Diferentes tipos de cadeias  $\alpha$  podem associar-se a um certo tipo de cadeia  $\beta$  e várias (por ex.  $\alpha 4$ ,  $\alpha 6$  e  $\alpha 5$ ) podem associar-se a mais de um tipo de cadeia  $\beta$ , sendo portanto a cadeia  $\beta$  que determina a subfamília das integrinas (Cronstein e Weissmann, 1993; Abbas *et al*, 1997; Mojcik e Shevach, 1997).

São expressas em diferentes tipos de leucócitos, o que varia de acordo com o estado de diferenciação e ativação da célula. Desse modo, tímócitos expressam  $\alpha 3\beta 1$  (ou VLA-3),  $\alpha 5\beta 1$  (VLA-5),  $\alpha 6\beta 1$  (VLA-6) e  $\alpha L\beta 2$  (LFA-1 ou CD11a/CD18). Células T maduras expressam  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 1$  e  $\alpha < \beta 2$ , mas apenas células T ativadas expressam  $\alpha 1\beta 1$  (VLA-1),  $\alpha 2\beta 1$ , ou  $\alpha 3\beta 1$ . A MAC-1 (CD11b/CD18) foi primeiramente identificada como marcador de células de origem mielóide e

mais tarde como mediador da adesão de leucócitos ao endotélio e outras superfícies. A LFA-1 possui funções importantes, entre elas a citotoxicidade de linfócitos T citotóxicos e de células NK, apresentação de antígenos e adesão de linfócitos ao endotélio. O ligante para CD11a,b/CD18 no endotélio e outros tipos de células é a molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1). Os ligantes das integrinas podem ser proteínas de matriz celular ou extracelular, e as integrinas podem ligar-se a mais de um ligante. Sendo assim,  $\alpha 4\beta 1$  liga-se à fibronectina (FN) e/ou à VCAM-1, mas em sítios diferentes. Inversamente, cada um ligante pode também unir-se por diferentes sítios a mais de uma integrina, por exemplo FN liga-se à  $\alpha 4\beta 1$ ,  $\alpha 5\beta 1$  e  $\alpha 4\beta 7$ . A capacidade de adesão das integrinas depende de seu estado de ativação por antígenos e mediadores inflamatórios; ligam-se a um ou mais ligantes dependendo se estão totalmente, parcialmente ativas ou inativas (Cronstein e Weissmann, 1993; Colvin, 1995; Mojcik e Shevach, 1997).

### Selectinas

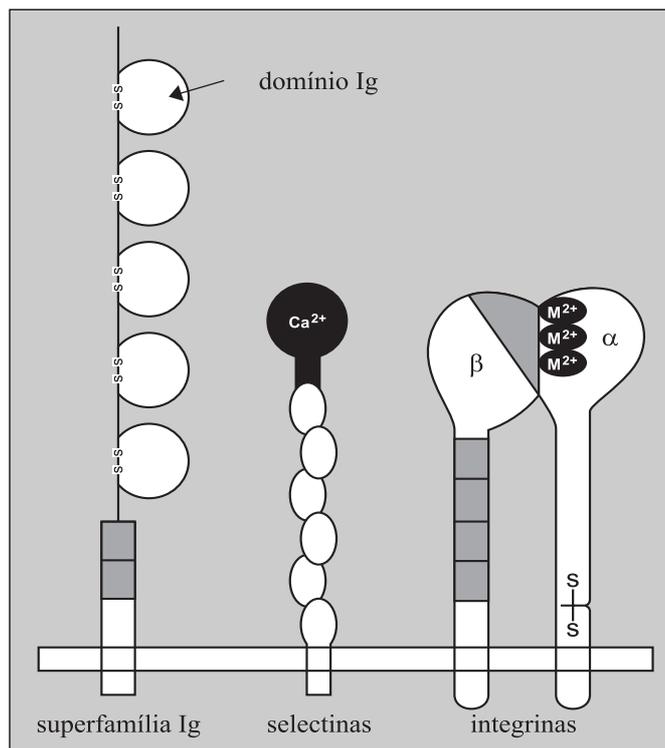
São constituídas de cadeias polipeptídicas transmembrana, as quais possuem um domínio lecitina amino-terminal dependente de cálcio, seguido de um domínio relacionado ao fator de crescimento epidermal (EGF), uma série de 62 repetições de complementos regulatórios de aminoácidos, uma região transmembrana e uma cauda citoplasmática; ligam-se aos carboidratos presentes nas células. (Cronstein e Weissmann, 1993; Lachmann *et al*, 1993; Roitt, 1996; Mojcik e Shevach, 1997)

A E-selectina é produzida nas células endoteliais vasculares, após estímulo com interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral (TNF) e polissacarídeos. A L-selectina é expressa em todos os leucócitos circulantes, com exceção de alguns linfócitos de memória. Os ligantes para a L-selectina incluem: GlyCAM-1 (molécula de adesão celular dependente de glicosilação), uma glicoproteína associada às vênulas endoteliais altas (VEA) de linfonodos periféricos; CD34, proteína de membrana expressa em todo o endotélio vascular e células-tronco hematopoiéticas e MadCAM-1. A P-selectina é encontrada nas membranas das plaquetas e é armazenada nos corpúsculos de Weibel-Palade das células endoteliais. É rapidamente mobilizada para a superfície da célula após estímulos similares aos da E-selectina (Cronstein e Weissmann, 1993; Colvin, 1995; Kansas, 1996; Mojcik e Shevach, 1997).

### Superfamília das Imunoglobulinas

Inclui proteínas de adesão tais como CD2, CD31, LFA-3 (antígeno 3 associado a função de leucócito) ICAM-1, ICAM-2, ICAM-3, VCAM-1, MadCAM-1 e NCAM-1 (molécula de adesão celular neural), bem como proteínas não adesivas incluindo Ig, receptor de

**FIGURA 3**  
**Moléculas de adesão**



(a) Moléculas de adesão pertencentes à superfamília das imunoglobulinas, com domínios Ig. (b) Moléculas de selectina, com um domínio lectina dependente de cálcio e repetições de complementos de aminoácidos. (c) Integrinas, compostas de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ . A cadeia  $\alpha$  possui 3 sítios que se ligam a metais e a cadeia  $\beta$  possui repetições ricas em cisteína. (Fonte: Kuby, 1994)

células T (TCR), CD3, CD4, CD8 e as proteínas do MHC. Todos os membros da superfamília possuem o domínio Ig, expresso em um variável número de repetições (Kuby, 1994; Colvin, 1995; Mojciak e Shevach, 1997).

A ICAM-1 é largamente distribuída em leucócitos, células endoteliais, fibroblastos e células epiteliais. ICAM-2 está presente em células endoteliais, linfócitos e monócitos enquanto a ICAM-3 apenas em linfócitos. VCAM-1 é expressa no endotélio ativado e a MadCAM-1 é expressa nas VEA dos órgão linfóides de mucosa, induzida por TNF $\alpha$ . Os ligantes para essas moléculas podem ser homotípicos ou heterotípicos. Assim, NCAM-1 liga-se a si mesmo, enquanto CD2 liga-se a LFA-3. As moléculas da superfamília das imunoglobulinas podem unir-se às moléculas das famílias das integrinas ou selectinas (Cronstein e Weissmann, 1993; Colvin, 1995; Abbas *et al*, 1997; Mojciak e Shevach, 1997).

### As doenças reumáticas sistêmicas

As investigações relacionadas à fisiopatologia das moléculas de adesão detém-se em caracterizar sua expressão, identificar as interações adesivas essenciais ao desenvolvimento ou progresso da autoimunidade, e determinar se a expressão das moléculas influencia na severidade da doença (Mc Murray, 1996).

### Artrite Reumatóide (AR)

É uma doença sistêmica do tecido conjuntivo cujas alterações predominantes ocorrem a nível das estruturas articulares, periarticulares e tendinosas. Manifesta-se através de inflamação que acomete principalmente a membrana sinovial (Moreira, 1997).

Existem várias funções atribuídas às moléculas de adesão na patogênese da AR: 1) atração celular inflamatória, 2) migração transendotelial de células inflamatórias para a sinóvia, 3) interações homo e heterotípicas em agregados perivasculares de células mononucleares periféricas, 4) ativação de citocinas e regulação positiva de integrinas, 5) ativação celular pela apresentação de antígenos, 6) angiogênese, 7) liberação das moléculas no soro e no líquido sinovial (Mojcik e Shevach, 1997).

São várias as interações adesivas que ocorrem: a expressão endotelial de P-selectina e de E-selectina tem sido detectada em membrana sinovial inflamada de pacientes com AR. A ICAM-1 está aumentada no tecido sinovial nesses pacientes. As células endoteliais expressam níveis elevados de P-selectina, E-selectina, LFA-3 (principalmente em sítios de inflamação intensa),  $\beta$ 3, VCAM-1, e níveis variados de ICAM-1, ICAM-2 e CD 31. Macrófagos de tecido sinovial expressam níveis elevados de VCAM-1, ICAM-3, CD31,  $\beta$ 1 ativado e níveis variáveis de ICAM-1, enquanto células dendríticas em agregados linfóides apresentam altos níveis de VCAM-1. Células sinoviais internas expressam altos níveis de ICAM-1, VCAM-1, CD 31, e  $\alpha$ M $\beta$ 2, mas não mostram elevação na expressão de L-selectina, P-selectina,  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 ou  $\alpha$ 6 $\beta$ 1. No líquido sinovial, linfócitos expressam níveis diminuídos de  $\alpha$ 2 $\beta$ 1, L-selectina, e ICAM-2, e níveis elevados de  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 3,  $\alpha$ 4,  $\alpha$ 5,  $\alpha$ 6,  $\alpha$ L $\beta$ 2, ICAM-1, CD2, LFA-3 e CD44. Em PMNs de líquido sinovial, são encontrados baixos níveis de L-selectina e CD44, e altos níveis de  $\alpha$ M $\beta$ 2 (Mc Murray, 1996; Mojciak e Shevach, 1997; Sfrikakis e Mavrikakis, 1999).

Algumas quimiocinas podem aumentar a adesividade dos leucócitos, entre elas: proteína inibitória de macrófagos 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), RANTES (célula T normal, expressa e secretada, regulada em ativação), proteína interferon-induzível 10 e C10. MIP-1 $\alpha$  e MIP-1 $\beta$  estão significativamente elevados no líquido sinovial e no soro de pacientes com artrite reumatóide. Entre as citocinas, são detectadas IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  e GM-CSF em cultura de células sinoviais *in vitro* e no tecido sinovial de pacientes com AR, são detectados TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 e TGF $\beta$  (Mc Murray, 1996; Mojciak e Shevach, 1997).

### Lupus Eritematoso Sistêmico (LES)

É uma doença inflamatória caracterizada pela formação de anticorpos anti-nucleares e deposi-

ção de complexos imunes. Manifesta-se predominantemente por lesões de pele do tipo inflamatórias, mucosites, serosites, vasculites e glomerulonefrites. Em indivíduos predispostos, o estímulo inicial pode ser dado por fatores ambientais associados aos gens de suscetibilidade, causando assim a doença. Sabe-se que ocorre uma falha no sistema imune, causando uma resposta imune anormal, envolvendo a ativação policlonal de linfócitos B e participação de células T hiperativas (Mc Murray, 1996; Mason e Isenberg, 1998).

Em pacientes com LES são detectados níveis elevados de ICAM-1, ICAM-2 e E-selectina em células endoteliais vasodérmicas e esse aumento está relacionado à severidade da doença. A E-selectina encontra-se em níveis elevados também no músculo esquelético de pacientes com LES. Músculos com infiltrado perivascular apresentam grande expressão de VCAM-1, comparados com pacientes sem infiltrado ou com amostras controle. A LFA-1 tem maior expressão em linfócitos de sangue periférico e LFA-1 e VLA-4 têm sido detectados em pacientes com vasculite. Mac-1 tem expressão aumentada em PMNs de pacientes com LES e está correlacionada à atividade da doença. Experimentos com cobaias demonstraram que os níveis de VCAM-1 elevam-se na glomerulonefrite decorrente do LES (Mc Murray, 1996; Nyberg *et al* 1997; Sfikakis e Mavrikakis, 1999).

No LES, E-selectina, LFA/ICAM-1 e VLA-4/VCAM-1 parecem ser as interações adesivas predominantes em sítios inflamatórios. Estudos sugerem que TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , e IL-1 estimulam a expressão de ICAM-1 e VCAM-1, particularmente no glomérulo (Mc Murray, 1996).

### Esclerodermia ou Esclerose Sistêmica (ES)

É uma desordem multissistêmica do tecido conectivo caracterizada pela diminuição da elasticidade da pele e de outros tecidos, resultante de uma fibrose que acomete progressivamente todos os órgãos, aparelhos e sistemas. Existem duas formas clínicas, a esclerose sistêmica limitada e a esclerose sistêmica difusa. O primeiro sinal da doença é geralmente o fenômeno de Raynaud, que ocorre em 90% dos pacientes, caracterizado por um vasoespasmó induzido pelo frio e estresse, através de uma seqüência trifásica: palidez, cianose e rubor. Embora a patogênese da esclerodermia não esteja totalmente esclarecida, sabe-se que interações entre células linfóides, células endoteliais e fibroblastos são importantes para a patogênese da doença (Moireira, 1997; Sato, 1999).

Pacientes portadores de esclerodermia possuem expressão aumentada de VCAM-1 e ICAM-1 nas células endoteliais das lesões inflamatórias primárias de pele. Níveis sorológicos de E-selectina e VCAM-1 solúveis refletem a severidade da doença. Níveis aumentados de ICAM-1 no soro estão relacionados com os

estágios iniciais da ES cutânea difusa (Denton *et al*, 1995; Sato, 1999).

Ihn *et al* demonstraram que níveis sorológicos elevados de E-selectina e VCAM-1 em ES estão relacionados com a presença e severidade da fibrose pulmonar. Níveis de VCAM-1 também se relacionam com alguns sinais inflamatórios sistêmicos como artrite/artralgia, VHS elevado e níveis de proteína C-reativa elevados. Stratton *et al* mostraram que níveis de E-selectina, VCAM-1, e ICAM-1 estavam elevados em pacientes com crise renal decorrente da esclerodermia; por outro lado, níveis de E-selectina e VCAM-1 estavam normais em pacientes com ES limitada e hipertensão pulmonar. Vaele *et al* comprovaram que pacientes com fenômeno de Raynaud apresentam níveis aumentados de ICAM no soro e níveis de E-selectina normais (Sato, 1999).

Os níveis sorológicos das moléculas de adesão referentes às doenças relatadas foram dosados pelo método de ELISA (Denton *et al*, 1995; Lai *et al*, 1996; Nyberg *et al*, 1997; Nasonov *et al*, 1999).

### Aspectos terapêuticos

Muitas drogas usadas na terapia de doenças reumáticas atuam sobre as moléculas de adesão. A colchicina diminui a expressão de L-selectina e diminui a função da E-selectina através dos microtúbulos. O metotrexato, similarmente, diminui a expressão da L-selectina e a função da E-selectina, bem como a adesão mediada por integrina. A Sulfasalazina diminui a expressão de  $\alpha$ M $\beta$ 2 em monócitos e pode também aumentar os níveis de adenosina. O tiomalato diminui a expressão de E-selectina e VCAM-1 nas células endoteliais sinoviais e diminui a produção de IL-8 e MCP-1. Corticosteróides diminuem a expressão de E-selectina e ICAM nas células endoteliais, fazem a regulação negativa de CD2 e  $\alpha$ < $\beta$ 2 no linfócito, diminuem a produção de IL-8 e MCP-1 e diminuem a regulação positiva de VCAM-1 e ICAM-1 no fibroblasto induzida por IL-1, TNF $\alpha$  e INF $\gamma$ . Por outro lado, a Ciclosporina A diminui a expressão de ICAM-1 enquanto anti-inflamatórios não esteróides inibem a adesão homo e heterotípica de neutrófilos mediada por integrinas  $\beta$ 2. A Fucoïdina mostrou ser eficiente na inibição do movimento e adesão de leucócitos em ratos (Mc Murray, 1996; Mojcik e Shevach, 1997).

Várias terapias anti-moléculas de adesão vêm sendo testadas, sendo que a grande parte envolve o uso de anticorpos monoclonais anti-CD18 ( $\beta$ 2 integrina). Experimentos feitos com coelhos comprovaram uma diminuição no exsudato inflamatório da célula, uma diminuição significativa no infiltrado celular subsinovial e na formação de folículos linfóides. Foi produzida uma ICAM-1 IgG, uma proteína que se liga a  $\alpha$ 4 $\beta$ 4; apesar de não ter sido testada em doenças reumáticas, promete ser eficiente (Mojcik e Shevach, 1997; Lockwood *et al*, 1999).

Alguns anticorpos monoclonais têm sido testados em artrite reumatóide. Em testes clínicos, anticorpos anti-citocina, como anti-TNF $\alpha$ , reduziram rapidamente

a inflamação e produziram melhora sintomática, relacionada com a dosagem e concentração plasmática do anticorpo. Anti-CD4 foi testado e em dosagens suficientes produziu melhora clínica. Pacientes em terapia com anticorpos monoclonais anti-ICAM-1 obtiveram melhora clínica a curto prazo. Em outros estudos, anticorpos monoclonais contra IL-1, IL-6 e IL-6R também foram efetivos contra AR (Abe e Takeuchi, 1996; Choy, 1996; Mc Murray, 1996).

Recentemente demonstrou-se a eficiência da combinação de anti-TNF $\alpha$ /anti-CD4 no tratamento da artrite reumatóide. Agentes TNF $\alpha$  biológicos como anticorpos monoclonais humanizados e receptor-TNF $\alpha$  recombinante estão sendo lançados no mercado. Essa terapia sozinha ou combinada ao metotrexato é muito efetiva em pacientes portadores da doença. Leflunomida e metotrexato são drogas clinicamente eficazes que interferem nos mecanismos envolvidos na inflamação e na destruição da integridade da junta sinovial, sendo portanto eficiente no tratamento da artrite reumatóide. Estudos revelam que provavelmente drogas anti-reumáticas tradicionais combinadas entre si ou não e combinadas a ciclosporina, rapamicina ou leflunomida serão em um futuro próximo a principal terapia para a artrite reumatóide (Dinant e Dijkmans, 1999; Forre *et al*, 2000; Kraan *et al*, 2000; Marinova-mutafchieva *et al*, 2000).

Em LES, estudos *in vitro* mostraram que a administração de anticorpos monoclonais anti-ICAM-1 diminuíram a adesão celular e a apresentação de antígenos estimulada por citocinas. Anticorpos anti-LFA-3 e anti-ICAM-1, combinados ou não, preveniram injúria glomerular em experimentos com ratos com glomerulonefrite. O anticorpo anti-LFA-1 inibiu a produção de auto-anticorpos, reduziu a proteinúria e prolongou discretamente a sobrevivência dos animais (Mc Murray, 1996).

## CONCLUSÕES

As investigações relacionadas a estrutura, função e regulação das moléculas de adesão, têm se expandido de uma maneira notável nos últimos tempos. Apesar de muitos aspectos a esclarecer quanto a sua função específica, pode-se afirmar que as moléculas de adesão certamente participam de maneira essencial nos processos que envolvem a resposta imune e que essas proteínas estão diretamente ligadas a patogênese de várias doenças reumáticas, destacando-se a artrite reumatóide.

Considerando-se a participação das moléculas de adesão na patogenia das doenças reumáticas e o número significativo da população mundial que é acometida por essas doenças, está claro que o estudo dos mecanismos de ação pelos quais agem essas moléculas bem como a administração terapêutica adequada, são de fundamental relevância.

As moléculas de adesão contribuem de forma significativa para que haja um maior entendimento

quanto a fisiopatogenia das doenças autoimunes reumáticas. Os avanços na área da biologia molecular e da produção de anticorpos monoclonais certamente levarão a esclarecimentos fundamentais e a identificação de novos alvos para a imunoterapia específica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A. K.; Lichtman, M. D.; Pober, J. S. *Cellular and Molecular Immunology*. 3rd ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1997.
2. Abe, T.; Takeuchi, T. Monoclonal antibodies as an immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nippon Rinsho*, 56:776-81, 1998.
3. Choy, E. H. Clinical pharmacology and therapeutic potential of monoclonal antibody treatment in rheumatoid arthritis. *Drugs Aging*, 12:139-48, 1998.
4. Colvin, B.; Bhan, A. K.; Mc Cluskey, R. T. *Diagnostic Immunopathology*. 2nd ed. New York: Raven Press, 1995.
5. Cronstein, B. N.; Weissmann, G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthritis and Rheumatism*, 36:147-154, 1993.
6. Denton, C. P.; Bickerstaff, M. C.; Shiwen, X. et al. Serial circulating adhesion molecule levels reflect disease severity in systemic sclerosis. *Br. J. Rheumatol.*, 34:1048-54, 1995.
7. Dinant, H. J.; Dijkmans, B. A. New therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Pharm. World Sci.*, 21:49-59, 1999.
8. Forre, O.; Haugen, M.; Hassfeld, W. G. New treatment possibilities in rheumatoid arthritis. *Scand. J. Rheumatol.*, 29:73-84, 2000.
9. Issekutz, A. C. Adhesion molecules mediating neutrophil migration to arthritis in vivo and across endothelium and connective tissue barriers in vitro. *Inflamm. Res.*, 47:123-32, 1998.
10. Kansas, G. S. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *The Journal of the American Society of Hematology*, 88:3259-3287, 1996.
11. Kraan, M. C.; Reece, R. J.; Barg, E. C. Modulation of inflammation and metalloproteinase expression in synovial tissue by leflunomide and methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. Findings in a prospective, randomized, double-blind, parallel-design clinical trial in thirty-nine patients at two centers. *Arthritis Rheum.*, 43:1820-30, 2000.
12. Kuby, J. *Immunology*. 2nd ed. U. S. A. : W. H. Freeman and Company, 1994.
13. Lachmann, R. J.; Walport, M. J.; Peters, K.; Rosen, F. S. *Clinical Aspects of Immunology*. v1. 5th ed. Boston: Blackwell Scientific Publications, 1993.
14. Lai, K. N.; Leung, J. C.; Lai, K. B. Upregulation of adhesion molecule expression on endothelial cells by anti-DNA autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol*, 81:229-38, 1996.
15. Lockwood, C. M.; Elliot, J. D.; Brettman, L. Anti-adhesion molecule therapy as a non-interventional strategy for autoimmune inflammation. *Clin. Immunol.*, 93:93-106, 1999.
16. Marinova-Mutafchieva, L.; Williams, R. O.; Mauri, C. A. comparative study into the mechanisms of action of anti-tumor necrosis factor alpha, anti-CD4, and combined anti-tumor necrosis factor alpha/ anti-CD4 treatment in early collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 43:638-44, 2000.
17. Mason, L. J.; Isenberg, D. A. Immunopathogenesis of SLE. *Baillieres Clin. Rheumatol.*, 12:385-403, 1998.
18. Mc Murray, R. W. Adhesion molecules in autoimmune diseases. *Semin. Arthritis Rheum.*, 25:215-33, 1996.
19. Mojcik, C. F.; Shevach, E. M. Adhesion molecules: a rheumatologic perspective. *Arthritis and Rheumatism*, 40:991-1004, 1997.
20. Moreira, C.; Carvalho, A. P. *Noções Básicas de Reumatologia*. v2. Belo Horizonte: Editora Health, 1997.
21. Nasonov, E. L.; Samsonov, M. I.; Titz, G. P. Soluble adhesion molecules (P-selectin, ICAM-1 and ICAM-3) in rheumatoid arthritis. *Ter Arkh*, 71:17-20, 1999.
22. Nyberg, F.; Acevedo, F.; Stephansson, E. Different patterns of soluble adhesion molecules in systemic and cutaneous lupus erythematosus. *Exp. Dermatol.*, 6:230-5, 1997.
23. Roitt, I.; Brostoff, J.; Male, D. *Immunology*. 4th ed. London: Copyright, 1996.
24. Sato, S. Abnormalities of adhesion molecules and chemokines in scleroderma. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 11:503-7, 1999.
25. Scrofernecker, M. L.; Pohlmann, P. R. *Imunologia Básica e Aplicada*. 1ª ed. Porto Alegre: Sagra luzato, 1998.
26. Sfikakis, P. P.; Mavrikakis, M. Adhesion and lymphocyte costimulatory molecules in systemic rheumatic diseases. *Clin. Rheumatol.*, 18:317-27, 1999.
27. Sfikakis, P. P.; Tsokos, G. C. Lymphocyte adhesion molecules in autoimmune rheumatic diseases: basic issues and clinical expectations. *Clin. Exp. Rheumatol.*, 13:763-77, 1995.

Endereço para correspondência:

Prof. Shirley Ramos da Rosa Utiyama  
Laboratório de Imunopatologia - Departamento de Patologia Médica  
Setor de Ciências da Saúde - UFPR  
Rua Padre Camargo, 280 - 80069-900 - Curitiba - PR  
Fax: (0xx41)264-4191

# Aplicação do “ELISA-conta” no diagnóstico da pitiose\*

## The use of “ELISA-conta” (ELISA-beads) in pitiosis diagnosis

Sydney Hartz Alves<sup>1</sup>; Cecília S. Boettcher<sup>2</sup>; Alexandre T. Leal<sup>3</sup>; Adriana Monteiro Leal<sup>3</sup>; José E. P. Silva<sup>4</sup> & Janio M. Santurio<sup>5</sup>

**RESUMO** – A pitiose é uma infecção endêmica em animais e considerada emergente em humanos que vivem em zonas pantanosas das regiões tropicais, subtropicais e temperadas. O diagnóstico laboratorial fundamentado no exame direto com KOH 10% e/ou histopatológico não evidencia características patognomônicas desta pseudo-micose. Por outro lado, considerando-se que o isolamento e identificação cultural podem ser demoradas, o diagnóstico imunológico se impõe como recurso de grande valia. No presente estudo relatamos uma metodologia para “ELISA-conta” aplicada a soros de coelhos imunizados com o antígeno de *Pythium insidiosum*. A metodologia proposta permite quantificar os anticorpos em diferentes estágios da imunização.

**PALAVRAS-CHAVE** – Pitiose; *Pythium insidiosum*; Micoses.

**SUMMARY** – *Pythiosi insidiosi* is an endemic animal infection which is emerging in humans from tropical, subtropical and temperate areas of the world. The diagnosis based on KOH mount and histologic features are not pathognomonic and culture and identification may be slowed. So, the immunologic techniques are important. Here, we report a methodology for “ELISA-conta” applied to sera of rabbits immunized with *Pythium insidiosum* antigen. The proposed methodology allowed to relate the antibodies levels to different immunization stage.

**KEYWORDS** – *Pythium insidiosum*; *Pythiosi insidiosi*; mycosis.

### INTRODUÇÃO

A pitiose é uma pseudo-micose que atinge os tecidos cutâneos e subcutâneos de humanos e animais em regiões tropicais, sub-tropicais e temperadas. Embora seja uma doença de maior prevalência entre animais (equinos, cães e bovinos), tem sido diagnosticada com aumentada frequência entre humanos<sup>3,5,15,17,18,19,20</sup>.

A doença é causada por um microrganismo aquático, *Pythium insidiosum*, semelhante a um fungo mas pertencente ao reino *Stramenopila*, filo *Oomycota* e classe dos *Oomycetes*. Este agente prefere ambientes pantanosos, úmidos e quentes onde produz zoósporos biflagelados móveis, que são atraídos por quimiotaxia aos tecidos lesionados de humanos ou animais<sup>1,11</sup>.

A infecção tem sido descrita em vários países do mundo, sobretudo na Tailândia, América Central, Nova Zelândia e Estados Unidos. No Brasil, a pitiose ainda não foi descrita em humanos; todavia, em animais, o número de casos é crescente<sup>8,9,13,14</sup>.

Clinicamente, a pitiose pode se apresentar nas formas cutânea, e subcutânea afetando sobretudo a região periorbital, face e lábios. A forma ocular ocasiona úlceras de córneas, enquanto que a forma sistêmica envolve o sistema vascular, com mórbidas consequências. A forma sistêmica ou vascular tem sido observada, principalmente, na Tailândia entre pacientes portadores de talassemia<sup>3,4,15</sup>.

O diagnóstico é baseado no exame direto e cultivo do material proveniente das lesões. Pus, exsudato e material biopsiado podem ser cultivados em ágar Sabouraud ou em ágar BHI. Após 24-48h a 28-37°C o desenvolvimento de micélio branco ou sem cor, evidenciando crescimento aéreo e submerso, é compatível com *Pythium insidiosum*. Microscopicamente observam-se hifas hialinas de 4-10µm de diâmetro, ramificadas e esparsamente septadas. A identificação requer a indução da zoosporogênese, permitindo a visualização de zoosporângios e zoósporos. Para isto, fragmentos de grama são distribuídos sobre a superfície de um meio sólido contendo colônias do *Pythium insidiosum*. Após 24h de incubação a 37°C os fragmentos vegetais são transferidos para um meio de indução (solução rica em sais) e incubados a 37°C/3h, quando então, ocorrerá a formação dos zoosporângios<sup>10,12</sup>. O exame histopatológico permite a visualização de hifas hialinas semelhantes as observadas nas zigomicoses<sup>12,13</sup>.

O diagnóstico sorológico tem sido estudado através da imunodifusão, fixação de complemento e enzima-imunoensaio<sup>6,7</sup>. O ELISA utilizando IgG ou IgM anti-equíno já foi empregado para diagnóstico nos Estados Unidos e também empregado para diagnóstico em humanos<sup>20</sup>. Outras provas laboratoriais já utilizadas incluem a imunofluorescência direta e immunoblot<sup>6,7</sup>.

O desenvolvimento de técnicas imunoenzimáticas (ELISA) esbarra, com frequência, no elevado custo da

Recebido em 31/1/2001

Aprovado em 31/2/2001

\*Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI). Universidade Federal de Santa Maria

<sup>1</sup>Professor Adjunto de Microbiologia Clínica; Departamento de Análises Clínicas; LAPEMI, UFSM; <sup>2</sup>Farmacêutica-bioquímica. Hospital Universitário de Santa Maria

<sup>3</sup>Médico veterinário. Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da UFSM; <sup>4</sup>Prof. Titular de Hematologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas, UFSM

<sup>5</sup>Prof. Adjunto de Micologia Veterinária; Departamento de Medicina Veterinária Preventiva; LAPEMI, UFSM

aquisição de um espectrofotômetro especial para a leitura de microplacas de titulação, onde o antígeno está adsorvido na própria placa. Vários autores buscando evitar tais custos, desenvolveram técnicas onde o antígeno está adsorvido a outros suportes sólidos como as pérolas de poliestireno. Silva J.E.(1992)<sup>16</sup> desenvolveu o "ELISA-conta" para diagnóstico da neurocisticercose, utilizando como suporte sólido alternativo, contas ou miçangas adquiridas em lojas de bijuterias.

Somando-se as características de pseudo-micose emergente entre humanos, com a importância econômica da mesma nos rebanhos eqüinos, delineia-se a necessidade de se dispor de uma técnica diagnóstica de baixo custo, acessível e que permita a utilização eventual, dadas as características epidemiológicas desta infecção. Com base nestes pareceres, o presente estudo objetivou avaliar o desempenho do "ELISA-conta" na medida de anticorpos *anti-Pythium insidiosum*, obtidos de coelhos imunizados.

## MATERIAL E MÉTODOS

**1 – Antígeno<sup>10,11,12</sup>:** a produção do antígeno utilizou uma amostra isolada no Rio Grande do Sul registrada no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva sob nº DMPV 118/98 e catalogada como CBS 101555. Este antígeno foi utilizado para imunização dos coelhos e adsorção das contas. O *Pythium insidiosum* foi cultivado em caldo Sabouraud sob agitação de 150 rpm durante 5 dias a 37°C. Esta cultura foi inativada com 0,02% de timerosal e, a seguir, filtrada em papel de filtro nº 1. A massa miceliana foi ressuspensa com tampão Tris com 1% de Triton 100, mantida em repouso durante 1 hora e imediatamente macerada aproximadamente 1h num disruptor de células manual. O macerado foi centrifugado a 7000 rpm/5 min e o sobrenadante chamado antígeno macerado de massa (AMM). A concentração de proteínas, determinada pelo método de Lowry foi de 3,3mg/ml.

**2 – Sensibilização das "contas" utilizadas como suporte sólido<sup>16</sup>:** contas de poliestireno, adquiridas em lojas de armarinho foram sensibilizadas por adsorção física com antígeno macerado de massa (AMM) em solução tamponada carbonato-bicarbonato (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,02M; NaHCO<sub>3</sub> 0,03M em pH 9,6) na concentração de 10 µg de proteínas por unidade de suporte. A incubação para adsorção foi de 12h a temperatura ambiente e sob lenta agitação. Após a incubação, as contas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato de sódio e PBS pH 7,2, secas em estufa a 37°C por 10 min e posteriormente armazenadas sob refrigeração a 4°C em frascos hermeticamente fechados. Para a realização dos testes utilizou-se uma conta por tubo.

**3 – Produção de antissoros<sup>10,11,12</sup>:** dez coelhos foram imunizados com antígeno AMM. Foram aplicadas três doses do antígeno, respectivamente nos dias zero, 14º e 28º. Os soros para os ensaios foram coletados nos dias zero, 21º e 35º. O sangue (1ml) era colhido da veia marginal da orelha, coagulado, centrifugado e o soro armazenado a -20°C. Obteve-se 30 amostras de soro, provenientes de dez coelhos imunizados,

conforme acima descrito. O material coletado no dia zero, serviu como controle negativo.

**4 – Conjugado<sup>16</sup>:** foram empregados anticorpos anti-IgG de coelho, conjugados com "horseradish" peroxidase (Difco) e diluído de acordo com as instruções do fabricante.

**5 – Solução cromogênica<sup>16</sup>:** 1mg de orto-fenilenodiamina (OPD) era diluído em 10 ml de tampão citrato-fosfato 0,15M (pH 5,0). No momento do uso, acrescentava-se 100µl de peróxido de Hidrogênio 30 volumes.

**6 – Técnica empregada<sup>16</sup>:** inicialmente as "contas" eram bloqueadas em solução de albumina (100 ml de PBS com 50ml de Tween 20 e 0,2g de albumina bovina) durante 1h/37°C. Após aspiração da solução de bloqueio, com trompa de vácuo, acrescentava-se em cada tubo, 0,2ml dos soros previamente diluídos a 1/10.000 no tampão diluidor de amostras. Realizava-se nova incubação de 60 min/37°C. A seguir, aspirava-se e lavava-se 5 vezes com o tampão de lavagem (100 ml de PBS + 50 µl e tween 20). Volumes de 0,2 ml do conjugado imunoenzimático IgG anti-coelho-peroxidase, previamente diluído a 1/5000 no tampão diluidor, eram acrescentados e incubados a 37°C/60 min. Após a repetição do processo de lavagem, foi iniciada a reação enzimática pela adição de 0,2ml da solução cromogênica. Depois de 15 min de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação era interrompida pela adição de 1,5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N. Finalmente, volumes de aproximadamente 1,5 ml do produto corado, eram transferidos para tubos de leitura em espectrofotômetro e realizada a leitura espectrofotométrica a 490 nm, zerando-se com o branco da reação.

**7 - Limiar de reatividade (cut off)<sup>2</sup>:** este valor foi estabelecido com base na média aritmética das densidades óticas (D.O.) dos controles negativos acrescidos de 2 desvios-padrão.

**8 – Reprodutibilidade inter-ensaio<sup>2</sup>:** foi determinada pela repetição do ensaio em 5 ocasiões diferentes, utilizando-se os mesmos soros e reagentes.

## RESULTADOS

O protocolo empregado permitiu quantificar com clareza a resposta imunológica através da técnica proposta.

Os soros controle negativos evidenciaram densidades óticas variáveis de 0,068 a 0,150 com média aritmética de 0,1063 (Tabela I) o que corresponde a ausência de anticorpos *anti-Pythium insidiosum*, demonstrando a especificidade da reação.

A avaliação dos soros obtidos após a 2ª imunização permitiu verificar D.O. variáveis entre 0,253 e 0,628, com média aritmética de 0,414 (Tabela I).

Após a terceira imunização, as D.O. variaram entre 0,345 e 0,859 com média de 0,599 (Tabela I).

A média aritmética das D.O. dos controles negativos acrescida de 2 desvios-padrão, indicou que a D.O. = 0,116 deve ser considerada como o limiar de reatividade (*cut-off*). A reprodutibilidade do ensaio, baseada em 5 repetições da técnica, permitiu estabelecer os desvios-padrões demonstrados na Tabela II.

**TABELA I**  
**Densidades óticas obtidos no "ELISA-conta"**  
**a partir de soros de coelhos imunizados**  
**e não imunizados com antígeno de *Pythium insidiosum***

Animais	Controles Negativos (Dia zero)	Soros do 21º dia de imunização	Soros do 35º dia de imunização
1	0,101	0,341	0,697
2	0,095	0,440	0,757
3	0,068	0,253	0,345
4	0,123	0,324	0,473
5	0,103	0,572	0,644
6	0,150	0,628	0,859
7	0,076	0,475	0,781
8	0,142	0,298	0,531
9	0,097	0,371	0,451
10	0,108	0,438	0,454
Média	0,1063	0,414	0,5992
Desvio Padrão	0,0035	0,0485	0,1215

**TABELA II**  
**Reprodutibilidade do "ELISA-conta"**  
**aplicado ao diagnóstico da pitiose**

Avaliações	Controle Negativo	Soros do 21º dia	Soros do 35º dia
1ª	0,1063	0,414	0,5992
2ª	0,1182	0,3857	0,6087
3ª	0,0916	0,3905	0,6043
4ª	0,1059	0,4001	0,6046
5ª	0,1040	0,3881	0,6012
Médias	0,1083	0,3956	0,6035
Desvios-padrão	0,0101	0,0103	0,0032

## DISCUSSÃO

O Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no Rio Grande do Sul, tem desenvolvido projetos em cooperação com a EMBRAPA (Corumbá-MS) objetivados ao diagnóstico clínico, laboratorial e a avaliação de um imunoterápico para tratamento da pitiose equina, desenvolvido na UFSM. O presente estudo demonstra os resultados iniciais da utilização de um ensaio imunoenzimático (ELISA) para o diagnóstico da pitiose e se constitui em parte de um projeto mais amplo.

Conforme já referido, a pitiose é mais frequente nos eqüinos, todavia, os relatos na espécie humana são crescentes e considerada por Kauffman como micose emergente<sup>6,7</sup>. A ocorrência desta micose se sobressai em regiões pantanosas e de clima quente, acometendo, sobretudo, o homem do meio rural<sup>17,18,19,20</sup>.

O diagnóstico da pitiose se baseia no exame macroscópico e microscópico das lesões, embora, deva-se ressaltar que podem apresentar problemas como dificuldade no isolamento e na histopatologia pois, as hifas cenocíticas são similares as observadas nas entomofotoromicoses causadas pelo *Conidiobolus coronatus* ou *Basiidiobolus ranarum*. Estas limitações diagnósticas, aliadas a ineficácia dos tratamentos, buscam no imunodiagnóstico, uma alternativa importante<sup>10,11,12</sup>.

A escolha do "ELISA-conta" para medida de anticorpos anti-*Pythium insidiosum* foi fundamentada na fácil operacionalização técnica e no baixo custo, pois,

a mesma, pode ser realizada em laboratórios clínicos de pequeno porte, uma vez que dispensa o espectrofotômetro leitor de microplacas<sup>16</sup>.

O estudo foi realizado com coelhos imunizados para permitir a padronização da técnica. Posteriormente a mesma será aplicada ao diagnóstico de eqüinos e humanos evidenciando sinais de pitiose.

Os resultados obtidos permitiram diferenciar animais sadios dos animais imunizados, bem como quantificar o aumento da curva de anticorpos. Os desvios-padrões calculados e o teste de reprodutibilidade atestam o bom desempenho da metodologia proposta. A determinação da sensibilidade, especificidade, valores preditivos e eficiência, só serão avaliados quando, com base nesta metodologia forem realizados ensaios com soros de pacientes, humanos ou animais, clinicamente doentes.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexopoulos, C. J.; Mims, C. W.; Blackwell, M. *Introductory Mycology*. 4<sup>th</sup> ed. John Wiley & Sons. Inc. N. York, 1996. p.61-85.
- Crowther, J. R.; Smith, H. *ELISA Manual*. Institute for Animal Health, Pirbright, Surrey, England (UK), 1990.
- Imwidthaya, P. Human pythiosis in Thailand. *Postgrad Med J*. 70: 558-560, 1994.
- Imwidthaya, P. Systemic fungal infections in Thailand. *J. Med. Vet. Mycol*. 32: 395-399, 1994.
- Imwidthaya, P. Mycotic keratitis in Thailand. *J. Med. Mycol*. 33:81-82, 1994.
- Kaufman, L.; Mendoza, L.; Standart, P. - Immunodiffusion test for diagnosing subcutaneous zygomycosis. *J. Clin. Microbiol*. 28:1887-1890, 1990.
- Kaufman, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. *Mycopathologia*. 143:3-7, 1998.
- Leal, A. T.; Monteiro, A. B.; Pinto, A. M.; Santurio, J. M. Pitiose bovina: primeiro relato no Brasil. In: *XXV Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária (Anais)*. Gramado (RS), 1997.
- Meireles, M. C. A.; Riet-Correa, F.; Fischman, O.; Zambrano, A. F. H.; Zambrano, M. S.; Ribeiro, G. A. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses*. 36:139-142, 1992.
- Mendoza L.; Ajello, L.; McGinnis, L. Infections caused by the oomycetes pathogen *Pythium insidiosum*. *J. Mycol. Med*. 6: 151-164, 1996.
- Mendoza, L.; Hernandez, F.; Ajello, L. Life cycle of the human and animal oomycete pathogen *Pythium insidiosum*. *J. Clin. Microbiol*. 31:2967-2973, 1993.
- Monteiro A. B. *Imunoterapia da pitiose equina: Teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo Pythium insidiosum*. Universidade Federal de Santa Maria, 1999. 52p. Dissertação de Mestrado em medicina Veterinária. Universidade Federal de Santa Maria.
- Santos, M. N.; Londero, A. T. Zigomicose subcutânea em cavalos. *Pesq. Agrop. Bras*. 9:7-8, 1974.
- Santurio, J. M.; Monteiro, A. B.; Leal, A. T.; Kommers, G. D.; Souza, R. S.; Catto, J. B. Cutaneous pythiosis insidiosii in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia*. 141:123-125, 1998.
- Sathapatayavongs, B.; Leelachaikul, P.; Prachaktam, R.; Atichartakar, V.; Sriphojanarts, S.; Trairatvorakul, P.; Jirasiritham, S.; Nontasut, S.; Eurvilaichit, C.; Flegel, T. Human pythiosis associated with thalassemia hemoglobinopathy syndrome. *J. Infect. Dis*. 159(2):274-280, 1989.
- Silva, J. E. P. *Padronização do Elisa-conta para cisticercose no líquido cefalorraquiano*. [Dissertação de Mestrado] Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1992.
- Thianprasit, M.; Chaiprasert, A.; Imwidthaya, P. Human pythiosis. *Curr. Top. Med. Mycol*. 7(1):43-54, 1996.
- Triscott, J. A.; Weedon, D.; Cabana, E. Human subcutaneous pythiosis. *J. Cutan. Pathol*. 20(3):267-271, 1993.
- Virgile, R.; Perry, H. D.; Pardanani, B.; Szabo, K.; Rahn, E. K.; Stone, J.; Salkin, I.; Dixon, D. M. Human infections corneal ulcer caused by *Pythium insidiosum*. *Cornea*. 12(1):81-83, 1993.
- Wanachiwanawin, W.; Thianprasit, M.; Fucharoen, S.; Chaiprasert, A.; Sudasna, N.; Ayudhya, N.; Sirithanaratkul, N.; Piankijagum, A. Fatal arteritis due to *Pythium insidiosum* infection in patients with thalassemia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg*. 87(3):296-298, 1993.

Endereço para correspondência:

Sydney Hartz Alves  
 Rua Venâncio Aires, 2766/403 - Santa Maria - RS - 97.010-004  
 Fone/Fax: (0xx55) 222-1024

# Bacteriúria assintomática: principais aspectos\*

## Asymptomatic bacteriuria: main aspects

Éryka Helena Trapp<sup>1</sup> & Beatriz Schlatter Hasenack<sup>2</sup>

**RESUMO** – A bacteriúria assintomática é comum em vários grupos da população e, na maioria das vezes, é benigna e não representa um problema clínico. No entanto, em algumas situações, parece estar associada com o desenvolvimento de efeitos adversos, entre eles, infecções do trato urinário sintomáticas. São múltiplos os fatores predisponentes da bacteriúria assintomática. O diagnóstico pode ajudar no acompanhamento dos casos e o programa de tratamento deve ser avaliado para cada caso especificamente.

**PALAVRAS-CHAVE** – Infecções do trato urinário; bacteriúria assintomática.

**SUMMARY** – *Asymptomatic bacteriuria is common in many population groups and, in most cases, it is benign and does not present itself as a clinical problem. Nonetheless, in some cases it seems to be associated with the development of adverse effects, such as symptomatic urinary tract infections. There are multiple factors that can lead to asymptomatic bacteriuria. Its diagnostic can help monitoring the cases and the treatment program must be evaluated for each case specifically.*

**KEYWORDS** – *Urinary tract infections; asymptomatic bacteriuria.*

### INTRODUÇÃO

As Infecções do Trato Urinário (ITU) podem ser definidas como invasão e multiplicação microbiana de qualquer tecido do trato urinário, desde a uretra até os rins, bem como estruturas subjacentes (Kunin, 1991). Elas podem ser classificadas em uretrites, cistites, prostatites e pielonefrites, dependendo da localização, e, de acordo com o tipo de infecção, podem ser sintomáticas, assintomáticas, agudas, recorrentes, crônicas, complicadas e descomplicadas (Sherk *et al*, 2001). As infecções do trato urinário sintomáticas são caracterizadas por diversas síndromes, nas quais há uma resposta inflamatória à invasão microbiana, em regiões específicas do trato urinário. Por outro lado, as infecções do trato urinário silenciosas ou assintomáticas, conhecidas como bacteriúrias significativas assintomáticas ou simplesmente bacteriúrias assintomáticas, são caracterizadas pela presença de bactérias na urina, acompanhadas ou não por respostas imune e inflamatória, com ausência de sinais e sintomas urinários e sistêmicos. (Kunin, 1991; Silva, 1999).

O conceito de bacteriúria significativa para o diagnóstico de infecções do trato urinário foi desen-

volvido por Kass (1955) e Sanford *et al* (1956) e indica o crescimento de  $10^5$  unidades formadoras de colônias (ufc) por mililitro de urina coletada pela captação limpa do meio da micção (método do jato médio). Originalmente, este crescimento era considerado altamente indicador de infecção, porém, a modificação desse critério tem sido sugerida por alguns autores. A Sociedade Americana de Doenças Infecciosas (Infectious Disease Society of America), por exemplo, tem definido cistite como o crescimento de  $10^3$  UFC/mL de bactérias em urina coletada através do método do jato médio e na presença dos sintomas mais comuns como disúria, urgência urinária, freqüência, desconforto suprapúbico, hematuria e incontinência. Desta forma, a interpretação adequada dos resultados de cultura de urina exige comunicação entre o clínico e o laboratório (Kunin, 1991; Kunin *et al*, 1993; Faro & Fenner, 1998). Por outro lado, o diagnóstico da bacteriúria assintomática parece ser mais complicado, pois é dificultado pela ausência de sintomas clínicos (Nicolle, 2000).

Na maioria das situações, a bacteriúria assintomática é benigna e não representa um problema clínico, retratando apenas um achado laboratorial ocasional. Porém, em determinados grupos, pode oca-

Recebido em 3/8/2001

Aprovado em 5/8/2001

\*Trabalho final de conclusão do Curso de Especialização em Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá (UEM) – Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Análises Clínicas

<sup>1</sup>Pós-graduanda: Farmacêutica-bioquímica. Docente do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

<sup>2</sup>Orientadora: Farmacêutica-bioquímica. Mestre em Microbiologia pela Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Docente do Departamento de Farmácia e Bioquímica da Universidade Norte do Paraná (UNOPAR).

sionar resultados adversos (Hooton *et al*, 2000). Assim, o objetivo deste trabalho é abordar os principais aspectos da bacteriúria assintomática.

## Desenvolvimento

### Definição

A bacteriúria assintomática tem sido definida por duas ou mais culturas de espécimes de urina sucessivos, coletados pela captação limpa do meio da micção, com crescimento do mesmo microrganismo igual ou maior a  $10^5$  UFC/mL, na ausência de qualquer sintoma (Kunin, 1991; Silva, 1999; Nicolle, 2000; Uronews, 2001a).

### Prevalência

A prevalência de bacteriúria assintomática em bebês não prematuros é inferior a 10% (Faro & Fenner, 1998). Durante a idade pré-escolar, a bacteriúria assintomática acontece em aproximadamente 1% das meninas e 0,03% dos meninos (Kemper & Avner, 1992).

Em mulheres jovens com idades entre 15 e 24 anos, a prevalência da bacteriúria assintomática é 1 – 2% (Silva, 1999; Stein & Funfstuck, 2000; Nicolle, 2000) e aproximadamente 5% nas mulheres jovens sexualmente ativas (Nicolle, 2000), sugerindo que a atividade sexual possa ser um fator de risco para a multiplicação de microrganismos no trato urinário feminino. Observa-se também que cerca de 30% das mulheres tem bacteriúria assintomática (normalmente passageira) imediatamente após relações sexuais (Silva, 1999). A prevalência da bacteriúria assintomática também aumenta com a idade, ocorrendo em 3 – 8% das mulheres pré-menopausadas (Faro & Fenner, 1998) e 5 – 10% em mulheres saudáveis acima dos 65 anos de idade (Silva, 1999). Entre as mulheres idosas (acima dos 80 anos de idade) funcionalmente inválidas e internadas em instituições ou hospitais, a prevalência de bacteriúria assintomática é excepcionalmente alta (20 – 53%) (Silva, 1999; Stein & Funfstuck, 2000; Nicolle, 2000). Nas mulheres grávidas, a prevalência desta condição é de 2 – 10% (Stein & Funfstuck, 2000), podendo ser maior na presença de outros fatores de risco, como condição sócio-econômica baixa, *Diabetes mellitus* e anormalidades anatômicas no trato urinário (Uronews, 2001a).

Em homens, a prevalência de bacteriúria assintomática é baixa, porém, esta taxa aumenta para 6 – 13% nos homens idosos (com mais de 65 anos de idade) ambulatoriais que moram na comunidade, 17 – 26% nos homens que moram em asilos e 30 – 34% nos homens internados em hospitais (Stein & Funfstuck, 2000; Uronews, 2001b).

São relatadas bacteriúrias assintomáticas em 50 – 100% dos pacientes com uso de cateter (Nicolle, 2000) e em 4 – 60% dos transplantados renais imunossuprimidos (Stein & Funfstuck, 2000). A bacteriúria assintomática também é elevada entre pacientes com *Diabetes mellitus*, onde a prevalência é aproximadamente três vezes maior em adultos do sexo fe-

minino (7,9 – 11,1%) (Faro & Fenner, 1998; Silva, 1999; Stein & Funfstuck, 2000; Ronald & Ludwig, 2001; Geerlings *et al*, 2001).

### Bacteriúria assintomática associada com resultados adversos

Em crianças, a bacteriúria assintomática na ausência de refluxo ou obstrução é benigna. O refluxo é uma causa comum de dano renal durante os primeiros 5 anos de vida e não é causado necessariamente por infecção, mas a infecção pode aumentar sua severidade. Bacteriúria assintomática em crianças pode ser um marcador ou potencializador do refluxo subjacente ou dano renal. Desta forma, crianças jovens com bacteriúria assintomática devem ser investigadas para infecções e anormalidades anatômicas (Faro & Fenner, 1998).

De acordo com estudos realizados em diferentes populações de mulheres jovens, não gestantes, a bacteriúria assintomática não está associada a efeitos adversos, como hipertensão, cicatrização renal ou falência renal (Silva, 1999; Nicolle, 2000). Porém, é relatado que 30% das mulheres jovens não-grávidas com bacteriúria assintomática progredirão para infecção do trato urinário sintomática em um ano e que a maioria das mulheres com triagem positiva para bacteriúria assintomática teve infecção do trato urinário previamente (Faro & Fenner, 1998).

Foi documentada morbidez significativa associada à bacteriúria assintomática em mulheres grávidas. Aproximadamente 30 – 40% das mulheres grávidas com bacteriúria assintomática (identificada no primeiro trimestre e sem tratamento prévio com antimicrobianos) desenvolvem pielonefrite durante a gravidez, na maioria das vezes, ao término do segundo ou no início do terceiro trimestre (Boucher *et al*, 1989; Silva, 1999; Stein & Funfstuck, 2000; Uronews, 2001a; Uronews, 2001c). Segundo Patterson & Andriole (1997), a bacteriúria assintomática é o principal fator de risco para o desenvolvimento de infecção do trato urinário sintomático na gestação e pode estar associada com efeitos adversos para a saúde materna e fetal. Incidência aumentada de partos prematuros, recém-nascidos com baixo peso, anemia materna e hipertensão induzida pela gravidez são efeitos que têm sido atribuídos à bacteriúria assintomática, porém o tema é polêmico (Silva, 1999; Stein & Funfstuck, 2000; Uronews, 2001a). O trabalho pioneiro de Edward Kass descreveu que 6% das mulheres grávidas tiveram bacteriúria assintomática associada com o aumento de prematuridade e mortalidade perinatal comparadas com mulheres com urinas estéreis (MacLean, 2001).

A bacteriúria (assintomática ou sintomática) é a infecção bacteriana mais freqüentemente documentada em pessoas idosas e a mais comum de todas as infecções nosocomiais. Além disso, é a causa mais freqüente de bacteremia e sépsis nos idosos (Uronews, 2001b). Alguns estudos informaram taxas de mortalidade significativamente aumentadas em po-

pulações de idosos com bacteriúria assintomática, enquanto que outros estudos não confirmaram totalmente esta associação (Nicolle, 1994).

Tem sido divulgado que existe um risco de 2 a 4% para o desenvolvimento de bacteriúria em pacientes que são submetidos a um episódio isolado de instrumentação do trato urinário. Por outro lado, quando a cateterização é a longo-prazo (mais de 30 dias), a bacteriúria acontece em quase todos os pacientes. Períodos de bacteriúria, que geralmente é polimicrobiana, podem alternar com períodos de urina estéril, ou bacteriúrias podem se tornar crônicas; em ambos os casos, as cepas infectantes freqüentemente mudam (Stamm & Hooton, 1993).

As mulheres com o *Diabetes mellitus* tem bacteriúria assintomática mais freqüentemente que as mulheres sem o *Diabetes mellitus*. Um estudo comparativo realizado por Geerlings *et al* (2001) concluiu que mulheres com o *Diabetes mellitus* tipo 2 e bacteriúria assintomática tiveram um risco aumentado de desenvolver infecções do trato urinário sintomática quando comparados àquelas sem bacteriúria. Além disso, demonstrou que a bacteriúria assintomática está associada a uma tendência de declínio mais rápido da função renal em mulheres com *Diabetes mellitus* tipo 1 durante o período do estudo (18 meses), mas não pode concluir que bacteriúria assintomática está associada com a progressão da doença renal nestas mulheres.

#### **Fatores de risco que predis põem à bacteriúria assintomática**

Como visto anteriormente, as mulheres e meninos têm uma prevalência maior de bacteriúria assintomática do que homens e meninos. Isto pode ser justificado pelas diferenças anatômicas entre os sexos e que são iguais àquelas que predis põem à infecção do trato urinário sintomática, como uretra muito mais curta nas mulheres e colonização bacteriana na área perineal e periuretral da vagina, tornando mais fácil a ascensão das bactérias para a bexiga (Mims *et al*, 1999; Uronews, 2001b). Um estudo realizado por Hooton *et al* (2000) demonstra que, para mulheres jovens, os fatores de riscos mais importantes para o desenvolvimento da bacteriúria assintomática são os mesmos que para infecção do trato urinário sintomática, particularmente o uso de diafragma com espermicidas e relações sexuais. Os espermicidas provavelmente aumentam o risco para infecção do trato urinário por alterar o ambiente vaginal e favorecer a colonização com uropatógenos (Hooton *et al*, 1996) e as relações sexuais predis põem à infecção por facilitar o movimento dos microorganismos até a uretra, promovendo o acesso dos mesmos à bexiga (Mims *et al*, 1999). Embora os casos de infecções do trato urinário adquiridas por homens em relações heterossexuais sejam aparentemente raros, parece que homens ativos em relações homossexuais correm mais riscos de bacteriúria (assintomática ou sintomática) causada por

microorganismos coliformes, contraídos durante o coito anal (Uronews, 2001b). Ainda em relação à predisposição para bacteriúria assintomática no sexo masculino, os meninos não circuncidados apresentam taxa significativamente mais elevada de bacteriúria assintomática do que os circuncidados, supostamente devido à colonização bacteriana do prepúcio no primeiro grupo. Após a primeira infância, o prepúcio retrai-se com mais facilidade, proporcionando melhor higiene peniana (Mims *et al*, 1999; Uronews, 2001b).

A idade é outro fator que, independentemente do sexo, faz com que haja maior prevalência de bacteriúria assintomática. Neste caso, a explicação parece estar relacionada ao estado de saúde e ao nível de capacidade funcional, que pode variar consideravelmente de um indivíduo para outro. Em geral, a maior ocorrência de infecções em pessoas idosas é atribuída aos seguintes fatores:

- 1) Maior exposição a patógenos secundários às alterações no meio ambiente como, por exemplo, bactérias resistentes adquiridas em hospitais;
- 2) Alterações na fisiologia do hospedeiro;
- 3) Resposta imune alterada (sistema imunológico em declínio); e
- 4) Comorbidade (Uronews, 2001b).

Vários fatores podem colocar pacientes portadores de *Diabetes mellitus* em alto risco de bacteriúria assintomática, entre eles estão as vaginites recorrentes, a neuropatia diabética com disfunção vesical neurogênica, o impedimento da função leucocitária secundária à hiperglicemia, a microangiopatia diabética e a instrumentação do trato urinário (Faro & Fenner, 1998; Uronews, 2001b). Tradicionalmente, o ensino mostra que bacteriúria assintomática está associada com o controle de glicose. No entanto, estudos mais recentes têm mostrado que a prevalência da bacteriúria assintomática não é significativamente influenciada pela duração do diabetes ou pela qualidade do seu controle (Faro & Fenner, 1998).

O cateterismo é um fator importante predisponente da infecção do trato urinário assintomática e sintomática (Mims *et al*, 1999). Fatores de risco significantes para cateter associado com a bacteriúria assintomática ou infecção do trato urinário sintomática incluem o sexo feminino, a idade avançada, a falta de terapia antimicrobiana sistêmica e a duração mais longa de cateterização (Saint & Lipsky, 1999).

Outros fatores que predis põem à bacteriúria assintomática são gestação, hiperplasia prostática benigna, cálculos renais, tumores, constrictões de qualquer natureza e fatores que impedem ou dificultam o esvaziamento completo da bexiga (Mims *et al*, 1999).

Vários fatores de virulência têm sido associados com cepas de *E. coli* que causam infecções do trato urinário sintomáticas, especialmente pielonefrite, mas aqueles associados com cepas causadoras de

**QUADRO 1**  
**Correlação entre bacterioscopia e contagens bacterianas em cultura**

Método de preparação	Correlação
sem centrifugação e sem coloração	1 ou mais germes por campo microscópico (400 X) indica usualmente mais de 10 <sup>6</sup> bactérias por mL
com centrifugação e sem coloração	1 ou mais germes por campo (400 X) indica títulos bacterianos iguais ou maiores de 10 <sup>5</sup> por mL
sem centrifugação e com coloração	visualização de 1 ou mais germes por campo (1000 X) indica geralmente 10 <sup>5</sup> ou mais germes por mL
com centrifugação e coloração	presença de 1 ou mais germes por campo de 1000 aumentos indica, como regra, títulos bacterianos de 10 <sup>4</sup> ou mais por mL

Retirado de Vallada, E. P. *Manual de Exames de Urina*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1997. p.157.

bacteriúrias assintomáticas ainda permanecem obscuros. No estudo realizado por Hooton *et al* (2000), foram testados hemolisina e papG, o gene que codifica a adesina nas fímbrias P, pois estes dois fatores têm sido normalmente mais prevalentes entre cepas que causam infecções clínicas severas do trato urinário. Neste estudo, as proporções de cepa de *E. coli* que foram positivas para hemolisina e papG foram praticamente idênticas entre mulheres com bacteriúria assintomática e àquelas com infecção do trato urinário sintomáticas. Os dados da tipagem do RNA ribossomal apontaram também que cepas idênticas de *E. coli* podem causar tanto a bacteriúria assintomática ou infecção do trato urinário sintomática num mesmo indivíduo. Portanto, o desenvolvimento de bacteriúria assintomática ou de infecção do trato urinário pode não refletir somente o fator de virulência do microrganismo, mas resultar de uma interação mais complexa entre a expressão fenotípica de fatores de virulência e a variabilidade biológica do hospedeiro (Nicolle, 2000).

### Diagnóstico laboratorial

A cultura bacteriana quantitativa de urina é considerada um procedimento padrão e obrigatório para o diagnóstico de infecções do trato urinário, inclusive para bacteriúria assintomática (Woods, 1999). A cultura é realizada inoculando-se meios apropriados com uma quantidade conhecida de urina, geralmente 0,01 mL ou 0,001 mL, com uma alça calibrada de plástico ou metal (Vallada, 1997).

A bacteriúria assintomática é freqüentemente um processo dinâmico, isto é, pode surgir e desaparecer em qualquer pessoa, a qualquer momento, motivo pelo qual, a aplicação de uma padronização microbiológica é necessária para o seu diagnóstico (Faro & Fenner, 1998; Nicolle, 2000). Na maioria das situações, uma única urocultura positiva para um determinado uropatógeno ( $\geq 10^5$  UFC/mL) é suficiente para caracterizar uma infecção do trato urinário. Entretanto, para o diagnóstico da bacteriúria assintomática, é recomendado que no mínimo 2 amostras sucessivas de urina, assepticamente coletadas,

sejam avaliadas e que das mesmas seja isolado o mesmo microrganismo com contagens elevadas ( $\geq 10^5$  UFC/mL) (Kunin, 1991; Silva, 1999; Nicolle, 2000; Uronews, 2001a). A necessidade de uma segunda amostra de urina para o diagnóstico da bacteriúria assintomática é questionada por Geerlings *et al* (2000). Estes pesquisadores reportam em seu trabalho que a identificação molecular realizada por eletroforese em gel de campo pulsado de 32 isolados de *E. coli*, obtidos de duas culturas consecutivas de urina de 16 pacientes diabéticos com bacteriúria assintomática, demonstrou discrepância entre os isolados de 7 pacientes, sugerindo que estes pacientes, na verdade, não apresentavam bacteriúria assintomática, mas haviam sido reinfectedos por uma cepa de *E. coli* diferente.

Os microrganismos isolados de pessoas com bacteriúria assintomática são geralmente semelhantes àqueles isolados de infecções sintomáticas. A *E. coli* foi o uropatógeno mais freqüentemente isolado na maioria dos estudos de bacteriúria assintomática, no entanto, outros microrganismos também foram encontrados, entre eles, as enterobactérias *Klebsiella sp* e *Proteus sp*, não fermentadores da glicose como *Pseudomonas sp* e os microrganismos Gram-positivos, como *Staphylococcus saprophyticus*, espécies de *Enterococcus* e estreptococos do grupo B (Uronews, 2001a).

Existem outros métodos mais rápidos para a caracterização de bacteriúria significativa que podem ser usados como exames de triagem para detecção de bacteriúria assintomática, principalmente em alguns casos especiais, como nas gestantes. Os procedimentos de triagem de bacteriúria significativa atualmente disponíveis para uso no laboratório de microbiologia clínica são representados pelos seguintes métodos:

- 1) exames microscópicos – preparações a fresco ou colorações;
- 2) testes químicos – detecção de enzimas bacterianas (catalase, glicose oxidase, nitrato redutase e tetrazólio redutase) e da leucócito esterase; e

- 3) sistemas automatizados – fotometria, bioluminescência e filtração colorimétrica (Cardoso *et al*, 1996; Vallada, 1997; Woods, 1999). Os resultados de triagem e cultura correlacionam-se bem quando a contagem de microrganismos for  $\geq 10^5$  UFC/mL, mas eles se comparam menos favoravelmente na presença de contagens mais baixas (Woods, 1999).

Os exames microscópicos de urina para a detecção de bacteriúria significativa podem ser realizados na prática bacteriológica por quatro procedimentos básicos:

- 1) exame a fresco da urina não centrifugada, visualizado em objetiva de 40 X;
- 2) observação do sedimento urinário a fresco com objetiva de 40 X;
- 3) exame com objetiva de imersão (100 X) do esfregaço de urina não centrifugada, corado pela técnica de Gram; e
- 4) esfregaço corado pelo Gram da urina centrifugada, examinado com objetiva de imersão (Cardoso *et al*, 1996). A correlação entre bacterioscopia e contagens bacterianas em cultura pode ser vista no Quadro 1.

O exame microscópico de uma gota de urina não centrifugada, corada pelo Gram, é considerado o método de triagem de mais fácil execução, mais barato e, provavelmente, o mais sensível e fidedigno para identificar espécimes de urina contendo mais de  $10^5$  UFC/mL (Washington *et al*, 1981; Woods, 1999). Cardoso *et al* (1996), com o objetivo de simplificar a detecção da bacteriúria significativa, comparou os resultados dos exames microscópicos de uma alça (10mL) e de uma gota (50mL) de urina não centrifugada, corada pelo Gram, e demonstrou equivalência dos dois métodos nos índices de eficácia (sensibilidade 98,78% e especificidade 99,62%) para a detecção de bacteriúria significativa. Concluiu, também, que a técnica da alça (10mL) pode ser utilizada como uma alternativa à clássica técnica da gota (50mL) apresentando como vantagem maior rapidez e simplicidade de execução. Como critério para o exame microscópico positivo recomendou a leitura de 10 campos microscópicos e a presença de pelo menos dois microorganismos por campo microscópico de imersão examinado.

Testes químicos comercialmente disponíveis em tiras que combinam nitrato redutase (uma enzima presente na maioria dos bacilos Gram-negativos que causam infecção urinária) e esterase leucocitária (uma enzima produzida por neutrófilos) são rápidos, baratos e simples de aplicar, mas suas sensibilidades são demasiado baixas para uso como triagem isolada para infecção do trato urinário (Woods, 1999). Tincello & Richmond (1998), relatam em seu trabalho que tiras reagentes de urina, que detectam sangue, proteína, esterase leucocitária e nitrato redutase, não são suficientemente sensíveis para serem usadas em triagens

para bacteriúria assintomática em mulheres grávidas, evidenciando uma sensibilidade de apenas 33% quando todos os quatro testes foram usados em combinação. De acordo com os autores, a cultura de urina deve permanecer como exame de escolha para investigar bacteriúria assintomática.

Outra questão que pode ser considerada nas triagens de bacteriúria é a capacidade de detectar a piúria (Woods, 1999). O método mais comumente utilizado para diagnosticar piúria é o exame microscópico do sedimento centrifugado da urina, que permite um relatório preliminar rápido (Kunin, 1991). Apesar de a infecção do trato urinário ser, sem sombra de dúvidas, a causa mais comum de piúria, outras condições importantes devem ser consideradas, como trauma geniturinário, neoplasias, pedras e corpos estranhos, glomerulonefrites, contaminação vaginal e antibioticoterapia concomitante (Kunin, 1991; Mims *et al*, 1999). Dogunro (1991) evidencia em estudos que, embora exista uma associação positiva entre piúria e bacteriúria, a ausência de células brancas em amostras de urina não exclui a bacteriúria, bem como a presença de piúria não seja necessariamente indicativa de bacteriúria significativa. Em relação a bacteriúria assintomática, Kunin (1991) relata que metade dos indivíduos nesta condição não apresenta piúria significante.

### Tratamento

Não são muitos os dados disponíveis sobre as potenciais complicações surgidas de bacteriúria assintomática, como o desenvolvimento de infecção sintomática e dano renal, e os benefícios alcançados pelo tratamento da mesma não são evidentes. Assim, o tratamento de mulheres não-grávidas, mulheres não-idosas, homens ou mulheres idosos e crianças em idade escolar não é incentivado, quando as vias urinárias nestes forem normais, pois as complicações são raras e parecem não justificar o uso rotineiro de agentes antimicrobianos como tratamento para prevenção de bacteriúria assintomática (Zhanel *et al*, 1990; Stamm & Hooton, 1993; Silva, 1999). Em mulheres não-grávidas, estudos chegaram a relatar que episódios de reinfecção sintomática ocorreram com mais frequência nas mulheres tratadas. Isto sugere um impacto negativo de terapia de antimicrobianos em processos de bacteriúria assintomática (Silva, 1999).

No entanto, para reduzir o risco notadamente aumentado para desenvolvimento de pielonefrite aguda e os riscos de prematuridade e baixo peso nos recém-natos, todas as mulheres grávidas com bacteriúria assintomática microbiologicamente documentada deveriam ser tratadas (Stamm & Hooton, 1993; Patterson & Andriole, 1997; Silva, 1999). A duração da terapia, selecionada com base na susceptibilidade, não é totalmente estabelecida, mas geralmente são recomendados três a sete dias de tratamento. Uroculturas pós-tratamento devem ser feitas para confirmar a cura (Patterson & Andriole, 1997; Silva, 1999).

O tratamento também tem indicação antes de intervenções urológicas, após transplantes renais, em neonatos, crianças pré-escolares e em pacientes com trato urinário anormal com bacteriúria assintomática (Zhanel *et al*, 1990; Stein & Funfstuck, 2000). Complicações pós-operatórias, inclusive bacteremia, são reduzidas reconhecendo e tratando bacteriúria assintomática antes de cirurgias urológicas (Stamm & Hooton, 1993).

Aparentemente, o tratamento de bacteriúria assintomática tem pequeno benefício em pacientes com cateteres, principalmente enquanto o cateter permanece *in situ*, pois o tratamento nestas circunstâncias promoverá, na maioria dos casos, o aparecimento de microrganismos resistentes (Stamm & Hooton, 1993; Silva, 1999). Um estudo sugeriu que mulheres com bacteriúria assintomática após cateterização devam ser tratadas, porém, são necessários estudos adicionais para confirmar esta conduta (Stamm & Hooton, 1993).

O tratamento sucedido de uma infecção urinária depende, entre muitos outros fatores, da eficácia das drogas antimicrobianas. Esta eficácia está limitada pela resistência bacteriana aumentada que vem sendo demonstrada por vários microrganismos. Uma experiência clássica disso é a resistência de *E. coli* à sulfonamidas, ampicilinas e trimetoprima-sulfametoxazol (Nicolle, 2000). Portanto, as recomendações de tratamento antimicrobiano para bacteriúria assintomática devem ser avaliadas para cada tipo de situação especificamente e não serem necessariamente aceitas como padrões de prática, já que o tratamento é normalmente controverso devido a falta de dados publicados descrevendo o curso natural de bacteriúria assintomática em várias populações de pacientes (Zhanel *et al*, 1990).

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A prevalência da bacteriúria assintomática revelou-se elevada em determinadas situações. Em alguns grupos observou-se uma relação entre a bacteriúria assintomática e o risco aumentado para o desenvolvimento de infecção do trato urinário sintomática e, em outros, uma associação com determinados efeitos adversos, como partos prematuros na gravidez e bacteremia em idosos. Assim, a bacteriúria assintomática deve ser considerada como um achado anormal podendo ser interpretada, entretanto, apenas no contexto em que for encontrada.

A necessidade de tratamento da bacteriúria assintomática não é um consenso entre os pesquisadores. No entanto, a maioria concorda que gestantes, pelo risco elevado de desenvolvimento de infecção urinária sintomática e complicações no parto, deverão ser tratadas.

A importância do estudo da bacteriúria assintomática pode estar no entendimento dos fatores que levam a ela, pois isto poderá ser útil na pesquisa de tratamentos alternativos das infecções sintomáticas,

como vacinação, colonização com microrganismos avirulentos e interferência seletiva das proteínas bacterianas de adesão.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Boucher, M.; Ledue, L. & Rinfret, D. The Pertinence of microscopic analysis of the urine as a diagnostic test for asymptomatic bacteriuria in pregnancy. *Un. Med. Can.* 118(4):162-166, 1989.
2. Cardoso, L. C. *et al*. Procedimento simplificado para detecção de bacteriúria significativa. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 28(1): 20-24, 1996.
3. Dogunro, A. S. A comparative study of pyuria and asymptomatic bacteriuria in school children. *Tropical Doctor*, 21(1): 26-28, 1991.
4. Faro, S. & Fenner, D. E. Urinary tract infections. *Clin. Obstet. & Gyn.*, 41(3):744-754, 1998.
5. Geerlings, S. E. *et al*. Is a second urine specimen necessary for the diagnosis of asymptomatic bacteriuria? *Clin. Infect. Dis.*, 31(3):3-4, 2000.
6. Geerlings, S. E. *et al*. Consequences of asymptomatic bacteriuria in women with *Diabetes mellitus*. *Arch. Intern. Med.*, 161(11):1421-1427, 2001.
7. Hooton, T. M. *et al*. A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *New Engl. J. Med.*, 335(7):468-474, 1996.
8. Hooton, T. M. *et al*. A prospective study of asymptomatic bacteriuria in sexually active women. *New Engl. J. Med.*, 343(14):992-997, 2000.
9. Kass, E. H. chemotherapeutic and antibiotic drugs in the management of infections of urinary tract. *Am. J. Med.*, 18:764-781, 1955.
10. Kemper, K. J. & Avner, E. D. The case against screening urinalyses for asymptomatic bacteriuria in children. *Am. J. Dis. Child.*, 146(3):343-346, 1992.
11. Kunin, C. K. *Infecções urinárias: diagnóstico, tratamento e prevenção*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1991. p.59-66.
12. Kunin, C. M.; White, L. V. & Tong, H. H. A reassessment of the importance of low-count bacteriuria in young women with acute urinary symptoms. *Ann. Intern. Med.*, 119(6): 454-460, 1993.
13. MacLean, A. B. Urinary tract infection in pregnancy. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17(4):273-276, 2001.
14. Mims, C. *et al*. *Microbiologia médica*. 1ª ed. São Paulo: Manole, 1999. p.221-228.
15. Nicolle, L. E. Urinary tract infection in the elderly. *J. Antimicrob. Chemother.* 33:99-109, 1994.
16. Nicolle, L. Asymptomatic bacteriúria - important or not? *New Engl. J. Med.*, 343(14):1037-1039, 2000.
17. Patterson, T. F. & Andriole, V. T. Detection, significance, and therapy of bacteriuria in pregnancy. Update in the managed health care Era. *Dis. Clin. North Am.*, 11(3):593-608, 1997.
18. Ronald, A. & Ludwig, E. When to do culture in urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 11(3-4):253-255, 1999.
19. Saint, S. & Lipsky, B. A. Preventing catheter-related bacteriuria: Should we? Can we? How? *Arch. Intern. Med.*, 159(8):800-808, 1999.
20. Sanford, J. P. *et al*. Evaluation of the positive urine culture. *Am. J. Med.*, 20:88-93, 1956.
21. Silva, C. H. P. de M. Infecção urinária assintomática em mulheres. *J. Bras. Patol.*, 35(2):99-103, 1999.
22. Skerk, V. *et al*. Antimicrobial therapy of urinary tract infections. *Lijecnicki Vjesnik*, 123(1-2): 16-25, 2001.
23. Stamm, W. E. & Hooton, T. M. Current concepts: management of urinary tract infections in adults. *New Engl. J. Med.*, 329(18):1328-1334, 1993.
24. Stein, G. & Funfstuck, R. Asymptomatic Bacteriuria. *Medizinische Klinik*, 95(4): 195-200, 2000.
25. Tincello, D. G. & Richmond, D. H. Evaluation of reagent strips in detecting asymptomatic bacteriuria in early pregnancy: Prospective Case Series. *BMJ*, 16(7129):435-437, 1998.
26. Uronews - Infecção do trato urinário durante a gravidez. [on line] Disponível na internet via [http://www.uronews.org.br/14\\_uro/14\\_indice.htm](http://www.uronews.org.br/14_uro/14_indice.htm). Arquivo capturado em março de 2001a.
27. Uronews - Avaliação dos fatores de risco de bacteriúria em homens. [on line] Disponível na internet via <http://www.uronews.org.br/indice13.htm#aval>. Arquivo capturado em março de 2001b.
28. Uronews - Distinção entre as alterações urológicas normais e as patológicas durante a gravidez. [online] Disponível na internet via [http://www.uronews.org.br/14\\_uro/14\\_indice.htm#distin](http://www.uronews.org.br/14_uro/14_indice.htm#distin). Arquivo capturado em março de 2001c.
29. Vallada, E. P. Manual de exames de urina. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 1997. p.146-158.
30. Zhanel, G. G., Harding, G. H. & Guay, D. R. Asymptomatic bacteriuria. which patients should be treated? *Arch. Intern. Med.*, 150(7):1389-1396, 1990.
31. Washington, J. A. *et al*. Detection of significant bacteriuria by microscopic examination of urine. *Am. Soc. Clin. Pathol.*, 12(5):294-296, 1981.
32. Woods, G. L. Coleta e manipulação de espécimes para diagnóstico de doenças infecciosas. In: Henry, H. B. *Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais*. 2ª ed. São Paulo: Manole, 1999. p.1323-1325.

Endereço para correspondência:

Av. Madre Leonia Milito, 1325 - Apto. 14/Bloco F, 86050-180, Londrina-PR