

RIBAC

REVISTA BRASILEIRA DE ANÁLISES CLÍNICAS

SUMÁRIO

Automação do exame de urina: comparação do Urisys 2400 com a rotina manual (Microscopia do Sedimento Urinário)	165
<i>Machado, M.H.T.; Gonçalves E.D.; Largura, M.A.; Gonçalves, A.; Andrade M.P. & Largura, A.</i>	
Automation of urine examination: a comparison of Urisys 2400 system with the routine manual process (Urinary Sediment Microscopy)	
Estudo comparativo de diferentes procedimentos para pré-tratamento de amostras de soro sanguíneo humano para determinação de cobre e zinco	169
<i>Anibal de Freitas Santos Júnior; Pedro Nascimento Prates Santos & Maria das Graças Andrade Korn</i>	
Comparative study in different procedures for human serum samples pretreatment to copper and zinc determination	
Variação interobservador no diagnóstico das lesões escamosas intra-epiteliais cervicais	173
<i>Mirian Pereira Rodarte & Paula Ávila Fernandes</i>	
Interobserver variability in the diagnosis of cervical squamous intraepithelial lesions	
Perfil de resistência aos antimicrobianos de <i>Pseudomonas</i> isoladas no Hospital Geral de Fortaleza	177
<i>Everardo Albuquerque Menezes; Liana Albuquerque Silveira; Francisco Afrânio Cunha; Márcio de Souza Cavalcante; Andréa Bessa Teixeira; Inácio Régis Nascimento Oliveira & Maria Núbia Cavalcante Salviano</i>	
Antimicrobials profile resistance from isolated <i>Pseudomonas</i> at the Fortaleza's General Hospital	
Determinação de monoclonalidade nas doenças linfoproliferativas crônicas de células B por citometria de fluxo	181
<i>Andréa Luciana de Araújo Cunha; 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; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva & Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior</i>	
Monoclonality determination by flow cytometry in B cell chronic lymphoproliferative diseases	
Importância da detecção de anticorpos antinucleares pela técnica de imunofluorescência indireta HEp-2 em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico	187
<i>Ana Cristina Maciel Vilar de Queiroz; Andréa Luiza Freire; Roberto Vasconcelos Chaves; Dyná Marcelino Atanásio; Sarah Dantas Viana Medeiros; Antônio Sérgio da Fonseca; Valéria Soraya de Farias Sales & Janaina Cristiana de Oliveira Crispim</i>	
The importance of antinuclear-antibodies detection in patients with Systemic Lupus Erythematosus by indirect immunofluorescence HEp-2 technic	
Atividade antifúngica de maleimidas contra dermatófitos isolados de <i>Tinea capitis</i>	191
<i>Aquino, P. M. L. P.; Lima, E. O.; Farias, M. P.; Freire, K. R. L.; Souza, E. L.; Cechinel Filho, V.; Correa, R.; Nunes, R. J. & Andricopulo, A.</i>	
Maleimides' antifungal activity against dermatophytes from <i>Tinea capitis</i>	
Avaliação dos pacientes submetidos à quantificação de células CD34⁺ por citometria de fluxo	195
<i>Renata da Silva; Sílvia I. A. C. P. Ferreira; Anália S. Cordoba & Patrícia Haas</i>	
Patients' avaliation submitted to quantification of CD34 ⁺ cells therapy by flow cytometry	
Parâmetros hemostáticos na gravidez normal e após o parto	203
<i>Luci Maria Sant'Ana Dusse, PhD; Lauro Mello Vieira, PhD & Maria das Graças Carvalho, PhD</i>	
Hemostatic parameters in normal pregnancy and postpartum	
Cistatina C: um novo marcador para filtração glomerular comparada ao clearance de creatinina e a creatinina sérica	207
<i>Toni Ricardo Martins; Cyntia M. T. Fadel-Picheth; Vânia M. Alcântara; Marileia Scartezini & Geraldo Picheth</i>	
Cystatin C: a new marker for glomerular filtration rate compared to creatinine clearance and serum creatinine	
Prevalência de enteroparasitos em moradores de vilas periféricas de Porto Alegre, RS	215
<i>Márcio de Assis; Fernanda P. Borges; Roberto C. V. Santos; Adroaldo Lunardelli; Patrick B. Gaspareto; Cássio M. Graziotin; Rafael V. Michel, Tiana Tasca & Geraldo A. De Carli</i>	
Survey of intestinal parasites among inhabitants of Porto Alegre Metropolitan area	
Índice remissivo	218

4

VOLUME 35

2003

Automação do exame de urina: comparação do Urisys 2400 com a rotina manual (Microscopia do Sedimento Urinário)

Automation of urine examination: a comparison of Urisys 2400 system with the routine manual process (Urinary Sediment Microscopy)

Machado, M.H.T.¹; Gonçalves E.D.^{2,3}; Largura, M.A.^{2,3}; Gonçalves, A.^{2,3}; Andrade M.P.^{2,3} & Largura, A.^{2,3}

RESUMO – O Urisys 2400 é um sistema totalmente automatizado de urinálises que fornece resultados semi-quantitativos para leucócitos, eritrócitos, nitrito, proteína, glicose, corpos cetônicos, urobilinogênio, bilirrubina, pH e cor através do uso de tiras reagentes, pelo método da reflectância, e, aspecto e densidade através de colorimetria e célula de fluxo (refratometria). O processo é automatizado desde a identificação das amostras por leitura de código de barras, até a pipetagem e medida das áreas reagentes. Os resultados podem ser transmitidos para uma impressora e ou para um sistema informatizado (interfaceamento). Fez-se um estudo de 3958 amostras de urina submetidas ao exame de rotina com o Urisys 2400, sendo que 2450 (61,89%) apresentaram exame físico-químico normal, número normal de leucócitos e eritrócitos. Estas amostras foram avaliadas relacionando os achados microscópicos do sedimento após centrifugação padronizada, enumerando leucócitos e eritrócitos e comparando-os com os resultados obtidos com o Urisys 2400. Houve uma concordância de 99,88% entre as duas metodologias. Os resultados apresentados sugerem que o sistema automatizado de exame de urina pode ser uma opção eficaz e segura para o laboratório de análises reduzir o tempo de análise, não havendo a necessidade da execução da sedimentoscopia nas urinas sem anormalidades físico-químicas.

PALAVRAS-CHAVE – Urinálise, microscopia, X.

SUMMARY – Urisys 2400 is a fully automated urinalysis system which provides semi-quantitative results for leukocytes, erythrocytes, nitrite, protein, glucose, ketones, urobilinogen, bilirubin, pH and color through the test strip by reflectance readings and aspect and density by colorimetry and cell flow (refractometry). The process is fully automated, from the sample selection to the test strip and photometric measurement of the reagent strip. Results can be transferred to an integrated printer or to some other computer system. It was made a study with 3958 urine samples, which were also part of the routine screening using Urisys 2400. The results demonstrated that 2450 (61.89%) had normal physico-chemical exams, a normal number of leukocytes and erythrocytes, and also any other cell alterations. These samples were evaluated considering the microscopic findings, according to a standardized centrifugation, by enumerating leukocytes and erythrocytes comparing them with the Urisys 2400 results. It was found a correlation between both methodologies (99.88%). The results suggested that the automated system of urine screening might be an effective and a safe choice to reduce the laboratory analysis time, without microscopic analysis in urine which does not have any physical-chemical abnormalities.

KEYWORDS – Urinalysis, microscopy, dipstick.

INTRODUÇÃO

A inclusão de métodos automatizados, padronizados e precisos na rotina laboratorial têm, nestes últimos anos, contribuído significativamente auxiliando aos médicos na decisão diagnóstica rápida e correta. No entanto, a rotina do exame de urina há muito tempo, na grande maioria dos laboratórios, ainda consiste no uso de tiras reagentes combinado com a microscopia quantitativa através de contagem em câmaras ou sedimento padronizado e contagem semi-quantitativa por campo^{1,2,3}. Alguns inconvenientes no uso de tiras reagentes semi-quantitativas são os bem conhecidos resultados falso-positivos e falso-negativos, quando as leituras não são padronizadas, principalmente, levando-se em conta a qualidade das tiras, o tempo entre a imersão da tira reagente na urina e a leitura visual da cor resultante da reação^{5,6,10,18}. Equipamentos, como o UF-100 (Sysmex), para análise dos elementos celulares, cristais e bactérias, baseado em citometria de

fluxo e impedância, específico para urinas positivas, têm sido usados em grandes rotinas^{4,5,6,7}. Recentemente, o Urisys 2400 (Roche Diagnostics), que é um sistema automatizado de urinálises, foi introduzido⁹. Este instrumento, além da automação, desde a leitura do tubo primário, execução dos testes, até a transferência de resultados (interfaceamento) para o sistema informatizado do laboratório, faz as leituras de tiras reagentes por reflectância, refratometria, baseada em célula de fluxo e colorimetria, com alta sensibilidade e reprodutibilidade para diversos analitos e com estas especificações, possibilita a execução de controle da qualidade adequado dentro dos padrões de boas práticas laboratoriais. Neste estudo, os autores comparam os resultados do Urisys 2400 e a microscopia do sedimento urinário. Em particular, pretendem comparar a análise dos resultados negativos do Urisys 2400 com a avaliação microscópica do sedimento urinário, levando-se em conta o número de leucócitos, eritrócitos e outros elementos, tendo como finalidade validar a ex-

Recebido em 4/8/2003

Aprovado em 4/8/2003

¹Centro de Educação Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Santa Catarina

²Laboratório Alvaro, Cascavel, Paraná, ³Instituto de Investigação Científica do Paraná

clusão da análise microscópica dos exames negativos ou normais, aceitando-se como definitivo o resultado do sistema automatizado.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas 3958 amostras de urina na rotina do Laboratório Alvaro durante o período de fevereiro a abril de 2003. Todas as urinas coletadas (jato médio) acondicionadas em frascos de poliestireno estéril, provenientes de hospitais e postos de coletas, ficaram estocadas à temperatura ambiente (21° C) e processadas em menos de duas horas após a coleta. As amostras foram transferidas para tubos de 10 mL e etiquetadas com identificação através de código de barras.

Urisys 2400 – Sistema automatizado(Roche Diagnostics)

O Urisys 2400 é um sistema automatizado de urinálises que utiliza tiras reativas, idênticas às do Miditron (aparelho leitor de tiras) e fornece resultados semi-quantitativos para leucócitos, eritrócitos, nitrito, proteína, glicose, corpos cetônicos, urobilinogênio, bilirrubina, hemoglobina/mioglobina e pH. A intensidade da reação de cor é detectada pela medida da percentagem de luz refletida. A densidade e a turbidez são medidas em célula de fluxo e é baseada na refratometria. A cor é avaliada com um algoritmo específico contra o branco da tira reagente. A análise dos leucócitos é revelada pela presença de esterases granulocíticas. Estas, decompõem um éster indoxílico em indoxil que reage com um sal de diazônio, produzindo uma cor violeta. Os eritrócitos, com ação semelhante à peroxidase da hemoglobina e da mioglobina, catalizam especialmente a oxidação do indicador através do peróxido de hidrogênio orgânico contido na zona de teste, originando uma coloração azul-esverdeada. O teste de nitrito é baseado no princípio da prova de Griess e é específico para nitritos, produz uma coloração rosa-vermelha na zona do teste. O teste da proteína baseia-se no princípio de um indicador de pH: a reação é particularmente sensível à albumina. A determinação da glicose é baseada na reação específica da glicose oxidase/peroxidase (método GOD/POD). O teste dos corpos cetônicos baseia-se no princípio da prova de Legal. A sensibilidade para o ácido acetoacético é superior à acetona. O urobilinogênio, um sal de diazônio estável reage quase instantaneamente com o urobilinogênio, originando um corante vermelho azulado. O teste da bilirrubina baseia-se na ligação da bilirrubina a um sal de diazônio. Para o pH, a zona do teste contém os indicadores: vermelho de metila, fenolftaleína e azul de bromotimol, que reagem especificamente com íons H⁺. A densidade e a turbidez é medida por célula de fluxo. Existe ainda uma zona de compensação que é uma área branca que não contém reagentes e que permite uma compensação, por parte do analisador, para a cor intrínseca da urina. O aparelho faz a análise das áreas de teste por reflectância. Os resultados são referidos como normal, negativo, positivo ou a concentração nominal do constituinte químico analisado e os dados são posteriormente impressos no relatório ou enviados diretamente para o servidor do sistema informatizado quando, então, são tratados adequadamente em um modelo de resultado do laboratório.

Foram considerados negativos ou normais os resultados que apresentaram todos os analitos e parâmetros dentro dos valores de referência estabelecidos pelo fabricante.

Os resultados de leucócitos e eritrócitos foram

classificados conforme dados fornecidos pelo fabricante. Para os leucócitos, 4 categorias: negativo, 25, 100, 500 por μL e para os eritrócitos, 6 categorias: negativo, 10, 25, 50, 150 e 250 por μL .

Microscopia - rotina manual

A análise do sedimento foi realizada de acordo com as diretrizes do NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards – USA*) GP16-A²⁴, onde 10 mL de amostra de urina é centrifugada por 5 minutos a 1480 rpm (rotações por minuto) e após o descarte do sobrenadante, o centrifugado (0,5 mL) é ressuspendido e 20 μL da suspensão são colocados entre lâmina e lamínula para análise microscópica em um aumento de 400 vezes. Após a análise de 10 campos (aumento de 400x), o valor médio de leucócitos e hemácias foi reportado como resultado. Considerado como normal o número de leucócitos menor que 5 por campo e eritrócitos menor que 3 por campo^{8,11,12,17,18,21,22,24}. Os achados microscópicos foram classificados em 5 categorias para os leucócitos: menor que 2, 3 a 5, 6 a 30, 31 a 100 e 101 a 500, por campo. Para os eritrócitos foram classificados 6 categorias: menor que 2, 3 a 5, 6 a 30, 31 a 100, 101 a 150 e 151 a 300, por campo.

RESULTADOS

Das 3958 amostras, 2450 (61,89%) apresentaram, na microscopia do sedimento, menos que dois leucócitos por campo, ausência de outros elementos e no equipamento Urisys 2400, resultado negativo para leucócitos, eritrócitos e sem alterações físico-químicas nos outros analitos (Tabela I). As 5 amostras negativas para leucócitos e eritrócitos no Urisys apresentaram resultados anormais quanto ao número de leucócitos na sedimentoscopia (6 a 30 por campo). As 530 amostras com 25 leucócitos por μL , anormal pelo método do Urisys 2400, apresentaram número de leucócitos normais pela microscopia (3 a 5 por campo) demonstrando a presença de falso-positivos usando-se esta metodologia. Os dados demonstram uma concordância de 99,88% para as urinas negativas ou normais pelas duas metodologias (2450/2455). Quanto ao número de eritrócitos (Tabela II), os resultados são concordantes entre as duas metodologias para todos os analitos, tanto negativos ou normais quanto positivos e anormais.

Utilizando o teste Qui-quadrado de independência pode-se afirmar ao nível de 1% de significância ($p < 0,01$), que não existe nenhuma associação entre os métodos utilizados para a contagem de leucócitos e os diagnósticos (negativo ou positivo) das amostras. Isto quer dizer que os métodos não influenciam na resposta (são independentes).

Utilizando o teste de proporção pode-se verificar, ao nível de 1% de significância, que não é significativa a diferença entre os resultados obtidos pelos métodos da esterase e da microscopia na contagem de leucócitos nas amostras, ou seja, a proporção de resultados falsos positivos de um método segundo o outro não é estatisticamente significativo.

Utilizando o teste de igualdade de proporções pode-se verificar, ao nível de 1% de significância, que não existe diferença estatística entre a proporção de resultados de diagnósticos negativos obtidos através do método da esterase e os obtidos através do método da microscopia, na contagem de leucócitos.

Verifica-se na Tabela II que as proporções de resul-

TABELA I
Resultados da contagem de leucócitos
pela microscopia comparada com
o teste da esterase (Urisys 2400)

Nº de amostras	Urisys 2400 Leucócitos/ μ L	Microscopia Leucócitos p/campo
2450	Negativo (*)	<2
5	Negativo (*)	6 a 30
530	25	3 a 5
570	25	6 a 30
193	100	31 a 100
210	500	101 a 500

(*) Negativo e sem alterações físico-químicas

TABELA II
Resultados da contagem de eritrócitos pela microscopia
comparada com o teste de peroxidase da hemoglobina
(Urisys 2400)

Nº de amostras	Urisys 2400 Eritrócitos/ μ L	Microscopia Eritrócitos p/campo
2658	Negativo (*)	< 2
320	10	3 a 5
520	25	6 a 30
210	50	31 a 100
70	150	101 a 150
180	250	151 a 300

(*) Negativo e sem alterações físico-químicas

tados negativos e positivos na contagem de eritrócitos utilizando o método da microscopia e o método de peroxidase de hemoglobina em uma amostra de 3958 pacientes são as mesmas.

DISCUSSÃO

A grande maioria das amostras de urinas analisadas apresenta resultados microscópicos e bioquímicos normais, principalmente quando os exames solicitados não têm indicação específica ou são de rotina, tanto na clínica particular, como na medicina do trabalho, em exames pré-adimensionais e outros. Em um estudo populacional em 20.000 amostras de urinas provenientes de trabalhadores na cidade de Tel Aviv (Israel), somente 10% das urinas apresentaram alguma anormalidade²¹. Alguns autores, em um estudo de 10.234 amostras de urinas, encontraram 5.000 (48,85%) amostras normais e propõem a liberação de resultado "urinas sem anormalidades" usando o fluxograma de Cristenson adaptado^{13,19,20,23}. Diversos estudos abordando a eliminação da microscopia nas urinálises são discutidos e existe um relativo consenso quando as urinas são negativas após análise com as tiras reagente^{13,14,15,16,17,20,21,22,23}.

Um resultado positivo na tira reagente é um pré-requisito usado com segurança para que a rotina da análise microscópica seja executada¹⁸. Em alguns serviços de diagnóstico (Laboratórios e Hospitais) as amostras de urina que apresentam resultados positivos através da tira são analisadas pelo UF-100 (Sysmex)^{4,5,6,7,8}. Este analisador enumera leucócitos, eritrócitos, células epiteliais, cilindros e bactérias, com uma boa performance analítica. Alguns autores, no entanto, sugerem e apresentam algumas restrições quanto ao uso desta metodologia devido a resultados falsos negativos e positivos⁹. Um fator importante e limitante para o uso na rotina é o custo do

equipamento associado aos reagentes específicos para a análise. Os equipamentos que, através de espectrofotometria de reflectância das tiras reagentes e sistemas automatizados, mostram serem eficientes e suficientes para uma rotina não muito grande de amostras de urina, têm melhorado a exatidão destes testes, bem como têm facilitado o controle da qualidade do procedimento. As combinações dos diversos analitos pesquisados aumentam significativamente a sensibilidade da urinálises.

No estudo apresentado, as 2450 amostras (61,89%) após análise no Urisys 2400 e a microscopia do sedimento urinário, foram concordantes (99,88%) e as amostras positivas (com alterações físico-químicas e ou presença de leucócitos e eritrócitos) no Urisys 2400 (38,10%), foram submetidas ao exame microscópico.

Os autores concluem, com base nos resultados apresentados, que é possível justificar a eliminação da microscopia de todas as urinas que através do Urisys 2400 expressarem resultados negativos ou normais em todos os analitos testados, diminuindo sensivelmente o tempo para liberação dos resultados, eliminando a digitação dos mesmos e conseqüentemente reduzindo o custo das análises.

REFERÊNCIAS

- Guder, W.G.; Kutter, D.; Bonini, P. From uroscopy to molecular analysis -improving diagnostic information from urine analysis. *Clin. Chim. Act.*, Jul; 297 (1-2): 1-3, 2000.
- Strasinger, S.K. *Urinalysis and body fluids*. F.A. Davis Company, Philadelphia, Pa, 1996.
- Lippman, R.W. Urine and urinary sediment. In *A Practical Manual and Atlas*., Charles C Thomas, Springfield, Ill, 1959.
- Ben-Ezra, J.; Bork, L.; Mcpherson, R.A. Evaluation of the Sysmex UF-100 automated urinalysis analyzer. *Clin. Chem.*, 44(1): 92-5, 1998.
- Fenili, D.; Pirovano, B. The automation of sediment urinalysis using a new urine flow cytometer (UF-100). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 36 (12): 909-17, 1998.
- Hannemann-Pohl, K.; Kampf, S.C. Automation of urine sediment examination: a comparison of the Sysmex UF-100 automated flow cytometer with routine manual diagnosis (microscopy, test strips, and bacterial culture). *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37 (7): 753-64, 1999.
- Regeniter, A.; Haenni, V.; Risch, L.; Köchli, H.P.; Colombo, J.P.; Frei, R.; Huber, A.R. Urine analysis performed by flow cytometry: reference range determination and comparison to morphological findings, dipstick chemistry and bacterial culture results—a multicenter study. *Clin. Nephrol.*, 55 (5): 384-92, 2001.
- Shaw, S.T.; Poon, S.Y.; Wong, E.T. 'Routine urinalysis'. Is the dipstick enough? *JAMA.*, 253 (11): 1596-600, 1985.
- Penders, J.; Fiers, T.; Delanghe, J.R. Quantitative evaluation of urinalysis test strips. *Clin. Chem.*, 48 (12): 2236-41, 2002.
- Kindrachuk, R.W.; Stamey, T.A. Urinalysis. In: Walsh, P.C.; Gittes, Rf.; Permuter, A.D.; Samoy, E.D.S. *Campbell's Urology*., 5th ed. Philadelphia, Pa: WB Saunders Co; 1956.
- Kunin, C. *Detection Prevention and Management of Urinary Tract Infections*. 4th ed. Philadelphia, Pa: Lea & Febiger; 1987.
- Winkel, P.; Statland, B.E.; Jorgensen, K. Urine microscopy, an ill-defined method, examined by a multifactorial technique. *Clin. Chem.*, 20 (4): 436-9, 1974.
- Dimech, W.; Roney, K., Evaluation of an automated urinalysis system for testing urine chemistry, microscopy and culture. *Pathology*., 34 (2): 170-7, 2002
- Winkens, R.A.; Leffers, P.; Trienekens, T.A.; Stobberingh, E.E. The validity of urine examination for urinary tract infections in daily practice. *Fam. Pract.*, 12(3): 290-3, 1995.
- Hofmann, W.; Regenbogen, C.; Edel, H.; Guder, W.G. Diagnostic strategies in urinalysis. *Kidney Int. Suppl.*, 47: S111-4, 1994.
- Kutter, D.; Braun, C.; Gallego, F.; Stirn-Thoma, S. Screening urine before microscopy, by automated test-strip. *Clin. Chem.*, 34 (8): 1600-2, 1988.
- Bartlett, R.C.; Zern, D.A.; Ratkiewicz, I.; Tetreault, J.Z. Reagent strip screening for sediment abnormalities identified by automated microscopy in urine from patients suspected to have urinary tract disease. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 118 (11): 1096-101, 1994.
- Peele, J.D.; Gadsden, R.H.; Crews, R. Semi-automated vs. visual reading of urinalysis dipsticks. *Clin. Chem.*, 23 (12): 2242-6, 1977.
- Costaval, J.A.; Massote, Ap.; Cerqueira, C.M.; Costaval, A.P.; Auler, A.; Martins, G.J. Qual o valor da sedimentoscopia em urinas com características físico-químicas normais? *J. Bras. Pato.*, 37 (4): 261-265, 2001.
- Wenz, B.; Lampasso, J.A. Eliminating unnecessary urine microscopy. Results and performance characteristics of an algorithm based on chemical reagent strip testing. *Am. J. Clin. Pathol.*, 92 (1): 78-81, 1989.
- Carel, R.S.; Silverberg, D.S.; Kaminsky, R. Aviram A. Routine urinalysis (dipstick) findings in mass screening of healthy adults. *Clin. Chem.*, 33 (11): 2106-8, 1987.
- Bartlett, R.C.; Kaczmarczyk, L.A. Usefulness of microscopic examination in urinalysis. *Am. J. Clin. Pathol.*, 82 (6): 713-6, 1984.
- Christenson, R.H.; Tucker, J.A.; Allen, E. Results of dipstick tests, visual inspection, microscopic examination of urine sediment, and microbiological cultures of urine compared for simplifying urinalysis. *Clin. Chem.*, 31(3): 448-50, 1985.
- NCCLS. Urinalysis and collection, transportation, and preservation of urine specimens; approved guideline. *NCCLS document GP 16-A*, Wayne, Pennsylvania, 1995.

Endereço para correspondência

Dr. Álvaro Largura
 Rua General Osório, 3212 - Cascavel, PR - 85801-110
 E-mail: alvaro@alvaro.com.br

Estudo comparativo de diferentes procedimentos para pré-tratamento de amostras de soro sanguíneo humano para determinação de cobre e zinco*

Comparative study in different procedures for human serum samples pretreatment to copper and zinc determination

Aníbal de Freitas Santos Júnior¹; Pedro Nascimento Prates Santos¹ & Maria das Graças Andrade Korn²

RESUMO – Quatro diferentes procedimentos analíticos de pré-tratamento de amostras para determinação de Cu e Zn em soro sanguíneo humano empregando a técnica analítica Espectrofotometria de Absorção Atômica (FAAS) foram testados em condições instrumentais comparáveis. Os procedimentos foram: diluição com água desionizada; diluição com surfactantes (Triton X-100, Brij 35, Tween 80 e CTAB) em concentrações na faixa de 0,001 – 1%; diluição com Triton X-100 e exposição à radiação ultra-sônica e, desproteinização com ácido tricloroacético. A precisão dos resultados foi avaliada e comparada entre os métodos e os resultados obtidos indicaram que o uso da diluição com água desionizada e com os agentes surfactantes (Triton X-100 e CTAB), e o tratamento com exposição ao ultra-som constituem metodologias que podem melhorar as condições para a determinação de Cu e Zn nesta matriz. As metodologias propostas permitiram maiores fatores de diluição e apresentaram ausência de interferências.

PALAVRAS-CHAVE – Soro sanguíneo, metais, pré-tratamento.

SUMMARY – Four different analytical procedures to sample pretreatment for copper and zinc determination in human serum employing Flame Atomic Absorption Spectrophotometry (FAAS) were tested in comparable instrumental conditions. The procedures were: dilution with desionized water; dilution with surfactants (Triton X-100, Brij 35, Tween 80 and CTAB) to concentrations in the range of 0.001 – 1%; dilution with Triton X-100 and exposition ultrasonic radiation and desproteinization with trichloroacetic acid. The results indicates that the use of the dilution with desionized water and with agents surfactants (Triton X-100 and CTAB) as well the treatment with exposure to the ultra-sound, constitute methodologies which can improve the conditions to Cu and Zn determination in the matrix. The methodologies proposed allowed larger dilution factors and presented absence of interferences.

KEYWORDS – Human serum, metals, pretreatment.

INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre a utilização dos elementos químicos pelos sistemas biológicos constitui objeto de constantes investigações. Os primeiros organismos vivos, indubitavelmente, usaram-nos como catalisadores para reações bioquímicas simples, para estrutura e construção de moléculas orgânicas. Os elementos químicos estão classificados, de acordo com a sua importância no organismo humano em: elementos essenciais, terapêuticos e não essenciais ou tóxicos. A Química Clínica constitui um ramo da Química em amplo crescimento, a qual é muito diversificada no que se refere à utilização de técnicas para estudos e determinação de espécies químicas constituintes de diferentes matrizes biológicas, mostrando-se presente em laboratórios de análises clínicas, na toxicologia forense, formulação de dietas e complementos alimentares, indústria farmacêutica, controle da qualidade em alimentos, etc. A importância de cobre e zinco tem sido documentada extensivamente desde a sua descoberta como elementos essenciais no metabolismo humano¹⁻³.

No reino vegetal, o cobre foi primeiramente identificado em cinzas de plantas, em 1816, por Bucholtz e, em 1817, por Meissner. Sua presença em animais foi demonstrada somente em 1830 por Sarzeau, que o encontrou no sangue de boi. Muito embora esses trabalhos descrevessem uma pequena quantidade de cobre em fluidos e tecidos, a sua essencialidade para o corpo humano foi estabelecida somente em 1921⁴, quando Badansky identificou este metal no cérebro humano e, a partir daí, foram estabelecidas as principais funções das biomoléculas contendo Cu, que é o transporte de elétrons e de oxigênio através das reações redox, como também, o envolvimento na mobilização de ferro para a síntese de hemoglobina. Sua deficiência no organismo caracteriza-se por manifestações como anemia, defeitos na formação do tecido conectivo, queratinização e pigmentação deficiente. A ingestão de quantidades elevadas do elemento é prejudicial ao organismo e o efeito nocivo mais pronunciado do excesso de cobre é a doença de Wilson, caracterizada pela falta de coordenação, ataxia e deteriorização mental progressiva⁵.

Recebido em 18/3/2003

Aprovado em 4/8/2003

¹ Departamento de Saúde, Ciências Farmacêuticas, da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Feira de Santana - Bahia

² Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia (UFBA)

A importância do zinco na nutrição humana tem sido reportada desde 1934, o qual é considerado um elemento traço essencial para o homem, pois está associado à produção de insulina, é componente de mais de 90 enzimas relacionadas com catálise ácido-base e está relacionado com a síntese do DNA e RNA. A deficiência deste metal no organismo, pode provocar retardo no crescimento das crianças, falta de apetite, lesões de pele, alopecia, dificuldades de cicatrização, etc. A ingestão de grandes quantidades deste metal resulta em febre, náuseas, vômitos e diarreia. A Tabela I indica os níveis estabelecidos de concentração de Cu e Zn em alguns fluidos biológicos⁶.

Apesar de alguns casos terem sido reconhecidos a longos anos (ferro, no século XVII e iodo, no século XIX), a história da descoberta da essencialidade de certos elementos químicos, é relativamente recente e a sua monitorização⁷ está intimamente associada ao desenvolvimento de métodos analíticos apropriados à detecção de micro-quantidades desses elementos, bem como a possibilidade de preparação de dietas alimentares isentas dos mesmos, a fim de se poder averiguar os efeitos da sua carência. Logo, é de extrema importância a quantificação destes metais em soro⁸⁻⁹.

O método ideal para medir baixas concentrações de metais (usualmente da ordem de $\mu\text{g/L}$ ou $\mu\text{g/kg}$) em material biológico deve ser sensível, simples, de baixo custo, rápido e seguro (exatidão e precisão). Diversos parâmetros devem ser analisados como limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), custo por amostra, capacidade multielementar e processamento. A Espectrofotometria de Absorção Atômica com chama Ar/acetileno (FAAS) tem sido largamente empregada para a determinação de metais traços devido à sensibilidade, simplicidade, maior liberdade de interferências, precisão e exatidão. Algumas dificuldades são reportadas para a determinação de metais em matrizes biológicas, empregando FAAS¹⁰⁻¹², uma vez que a complexa composição dos fluidos biológicos pode interferir na análise. Isto implica em um pré-tratamento da amostra, visto que as propriedades físicas da amostra, por exemplo, viscosidade¹³ e tensão superficial podem influenciar bastante o sinal analítico, produzindo variações no tamanho das gotículas do aerossol gerado, transporte da amostra e, conseqüentemente, na concentração do analito, gerando falsos resultados. A escolha do método ideal para pré-tratamento de amostras deve ser baseada em parâmetros específicos, tais como: concentração dos metais analisados; natureza (sólido, líquido, etc) e tipo de matriz biológica¹⁴, pois geralmente, materiais sólidos requerem um processo de digestão/dissolução antes da etapa de quantificação, enquanto que líquidos podem ser diretamente introduzidos nos equipamentos ou necessitam de uma simples diluição aquosa e/ou com agentes surfactantes; o tamanho da amostra, que vai implicar na escolha de uma quantidade representativa da amostra e, a técnica instrumental usada.

Os objetivos deste trabalho são: investigar o efeito de soluções de agentes surfactantes¹⁵ Triton X-100, Brij 35, Tween 80 – surfactantes não iônicos – e CTAB – surfactante catiônico – sobre o sinal analítico de Cu e Zn em amostras de soro sanguíneo humanos através de quatro diferentes procedimentos de pré-tratamento da matriz (diluição aquosa, diluição com agentes surfactantes, efeito da radiação ultrasônica e desproteinização).

TABELA I
Níveis normais de Cu e Zn em fluidos biológicos humanos

Fluido biológico	Concentração. ($\mu\text{g/mL}$)	
	Cu	Zn
Soro sanguíneo	0,70 – 1,65	0,80 – 1,20
Plasma	0,75 – 1,60	0,80 – 1,10
Eritrócito	0,56 – 1,12	9,40 – 11,80
Fluido espinhal	0,02 – 0,11	0,02 – 0,10
Leite	0,20 – 1,32	0,70 – 4,33

MATERIAIS E MÉTODO

Amostras de sangue foram coletadas em seringas de poliestireno e agulhas de aço inoxidável e, seguidamente, centrifugadas para obtenção do soro sanguíneo. As amostras foram acondicionadas em tubos de ensaios (12x75mm) e conservadas em geladeira (2–8°C), até análise (no máximo, 30 dias).

Tendo como proposta de trabalho a investigação de Cu e Zn em soro sanguíneo humano, definiram-se os seguintes procedimentos para pré-tratamento das amostras: (a) diluição com água desionizada; (b) diluição com agentes surfactantes (Triton X-100, Brij 35, Tween 80 e CTAB), (c) diluição com Triton X-100 com exposição à radiação ultrasônica e (d) desproteinização com ácido tri-cloro-acético.

Nos procedimentos (a) e (b) foi tomada uma alíquota de $0,2\mu\text{L}$ de soro sanguíneo, diluiu-se para balão volumétrico de $10\mu\text{L}$ com água desionizada ou solução do agente surfactantes, conforme o procedimento e, em seguida, procedeu-se a análise no FAAS.

No procedimento (c) uma alíquota de $1000\mu\text{L}$ de amostra foi tomada e levada para balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com solução do agente tensoativo Triton X-100 em meio de HNO_3 1%, sonificadas por 10 minutos e seguida de leitura no FAAS.

No procedimento (d) uma alíquota de $1000\mu\text{L}$ de amostra foi tomada e levada para um tubo de ensaio contendo 5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (TCA), a 5,0% em seguida, centrifugou-se por 5 minutos e do líquido sobrenadante, foi retirada uma alíquota de $1,0\mu\text{L}$ e transferida para um balão volumétrico de $10\mu\text{L}$, completando-se o volume com água desionizada.

As medidas de absorvância foram efetuadas utilizando um espectrofotômetro de absorção atômica com chama (FAAS), marca Varian, modelo 220, com corretor de *background* de lâmpada de deutério e lâmpadas de cátodo de zinco, cobre e manganês e chama ar/acetileno com especificações contidas na Tabela II. Para promover a exposição das amostras à radiação ultrasônica, foi utilizado um sistema de sonicação com um banho ultra-sônico Branson 3510 com 40 khz de frequência.

Todos os reagentes utilizados possuem grau analítico e as soluções foram preparadas com água destilada-desionizada. As vidrarias e recipientes de polipropileno foram descontaminados com solução de HNO_3 10% (v/v) *overnight* e, então lavadas com água deionizada.

As curvas analíticas para Cu e Zn na faixa de concentração de 0 – $1000\mu\text{g/L}$ foram preparadas diariamente para a realização das análises de soro sanguíneo humano. Os experimentos foram realizados em triplicata, ensaios em branco foram preparados para cada procedimento proposto. Para determinar os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) das metodologias pro-

TABELA II
Condições de operação do Espectrômetro de Absorção Atômica com Chama Ar/Acetileno (FAAS)

Parâmetro	Cu	Zn
Comprimento de onda (nm)	324,8	213,9
Corrente da lâmpada (mA)	4	5
Largura de fenda (nm)	0,5	1,0
Chama	Ar/Acetileno	Ar/Acetileno
Modo de calibração	Linear	Linear
Padrões	0 – 1,0	0 – 1,0

TABELA IV
Resultados da determinação de Cu em soro sanguíneo utilizando vários procedimentos de pré-tratamento

Amostras	Concentração de Cu ($\mu\text{g/mL}$)			
	Procedimento (a)	Procedimento (b)	Procedimento (c)	Procedimento (d)
Soro 1	0,75 \pm 0,01	0,69 \pm 0,02	0,71 \pm 0,03	0,80 \pm 0,04
Soro 2	0,79 \pm 0,02	0,84 \pm 0,01	0,77 \pm 0,01	0,73 \pm 0,01
Soro 3	1,24 \pm 0,01	1,28 \pm 0,02	1,33 \pm 0,02	1,31 \pm 0,02
Soro 4	1,35 \pm 0,03	1,37 \pm 0,03	1,40 \pm 0,02	1,39 \pm 0,03

postas foram realizados 30 ensaios em branco em dias alternados, durante o período em que a etapa experimental foi executada. O valor do LD foi obtido multiplicando-se o desvio padrão referente à média dos 30 ensaios em branco por 3, ou seja, (3s) e o LQ, multiplicando-se o desvio padrão por 10, isto é (10s)¹⁶. Os valores para LD e LQ são apresentados na Tabela III.

RESULTADOS

Os resultados para determinação de Cu e Zn, pelos diferentes procedimentos, são apresentados nas Tabelas IV e V. Estes correspondem às médias de 3 replicatas para cada uma das amostras e os respectivos desvios.

a) Diluição de soro sanguíneo com água desionizada

Em procedimentos diretos, a alta viscosidade devido ao grande conteúdo de proteínas pode afetar a eficiência de nebulização de algumas amostras, promovendo variações na velocidade de aspiração até o atomizador, gerando falsos resultados. Os métodos de diluição de amostras biológicas, são principalmente usados para fluidos biológicos, especialmente, soro sanguíneo e urina. A principal função dos agentes diluentes consiste em superar o efeito da viscosidade da matriz. Porém, o fator da diluição deve ser avaliado cuidadosamente a fim de que a concentração do analito não seja reduzida a níveis inferiores ao limite de detecção e quantificação da técnica analítica empregada. Como a técnica FAAS apresenta boa sensibilidade para Cu e Zn, foi possível a realização de medidas reprodutíveis, dentro do erro analítico aceitável, permitindo diluições com soluções aquosas, de até 50 vezes para determinação de Cu e Zn em soro. As curvas analíticas foram preparadas, diariamente, em meio aquoso na faixa de concentração de 0–1,00 $\mu\text{g/L}$, respectivamente, apresentando boa linearidade, podendo-se desta forma, analisar soro sanguíneo sem problemas, minimizando as interferências que poderiam ser provocadas pela matriz.

TABELA III
Limites de detecção e quantificação instrumental e Faixa Ótima de Trabalho do FAAS

Metal	Limite de detecção $\mu\text{g/mL}^a$	Limite de Quantificação $\mu\text{g/mL}^b$	Faixa Ótima de Trabalho $\mu\text{g/mL}$
Zn	5,00	17,00	0,010 – 2,00
Cu	8,00	26,00	0,030 – 10,00

a = 3 vezes o desvio-padrão de 30 medidas do branco expresso em concentração
b = 10 vezes o desvio-padrão de 30 medidas do branco expresso em concentração
Branco = água desionizada

TABELA V
Resultados da determinação de Zn em soro sanguíneo utilizando vários procedimentos de pré-tratamento

Amostras	Concentração de Zn ($\mu\text{g/mL}$)			
	Procedimento (a)	Procedimento (b)	Procedimento (c)	Procedimento (d)
Soro 1	1,17 \pm 0,01	1,19 \pm 0,02	1,13 \pm 0,03	5,89 \pm 0,04
Soro 2	0,98 \pm 0,01	0,96 \pm 0,02	1,02 \pm 0,03	6,10 \pm 0,07
Soro 3	1,09 \pm 0,02	1,11 \pm 0,03	1,07 \pm 0,01	8,27 \pm 0,11
Soro 4	1,08 \pm 0,03	1,13 \pm 0,01	1,09 \pm 0,02	2,70 \pm 0,06

b) Diluição com agentes surfactantes (Triton X-100, Brij 35, Tween 80 e CTAB)

O emprego de agentes tensoativos nas determinações analíticas têm sido muito difundido visto que promovem redução da tensão superficial, diminuindo o tamanho das partículas do aerossol, o que promove um maior fluxo de amostras à chama. O uso de soluções de Triton X-100 (4-octil-fenol polietóxilato) é bastante documentado na determinação de metais em amostras biológicas, tornando seu uso quase universal. Como proposta de investigação, foram avaliados outros agentes tensoativos pouco descritos na literatura para diluição de soro sanguíneo. Utilizaram-se, além do Triton X-100, os agentes surfactantes não-iônicos Brij 35 (polioxietileno monolauril éter) e Tween 80 (polioxietileno sorbitano monooleato) e o agente tensoativo catiônico CTAB (brometo de cetil-trimetil-amônio). Com o objetivo de avaliar, primeiramente, o efeito de soluções de Triton X-100, Brij 35, Tween 80 e CTAB na faixa de concentração de 0,001 a 1,0% sobre o sinal analítico de Cu e Zn, pôde-se concluir que para Cu não foi observado nenhum ganho analítico para soluções dos agentes tensoativos usados no trabalho. Para Zn, soluções de Triton X-100 0,001% e 0,1% e soluções de CTAB 0,001% mostraram um ligeiro aumento nos valores de absorvância em padrões de Zn com concentrações mais baixas (0–200 $\mu\text{g/L}$). Por outro lado, o sinal analítico não sofreu alterações significativas com o aumento da concentração de soluções de Tween 80 e Brij 35. Portanto, concluiu-se Triton X-100 e CTAB podem ser usados para minimizar o efeito das propriedades físicas da matriz, permitindo resultados precisos e reprodutíveis. As curvas analíticas apresentaram boa linearidade, podendo-se desta forma analisar soro sanguíneo sem problemas, minimizando as interferências que poderiam ser provocadas pela matriz.

c) Diluição com tensoativo e exposição à radiação ultrasônica

A partir do estudo anterior, aplicou-se o procedimento de diluição de amostras de soro sanguíneo com Triton X-100 0,01%, seguida de exposição à radiação ultrasônica por 10 minutos. Os ultra-sons são ondas mecânicas

($v > 16$ KHz), que se propagam através de meios materiais¹⁷. A ação do ultra-som em sistemas químicos se dá por agitação, aquecimento e/ou cavitação. Quando sistemas heterogêneos (sólido-líquido) são sonicados, as bolhas de cavitação se formam na proximidade do sólido, podendo levar à fusão ou desagregação do material, facilitando a ação dos solventes. O emprego desta técnica em processos de pré-tratamento de amostra pode ser uma metodologia alternativa e inovadora. Com a ação das ondas ultra-sônicas, observou-se que a viscosidade da amostra foi diminuída e os resultados indicaram que este procedimento pode ser usado para a determinação de Cu e Zn em soro sanguíneo humano uma vez que se mostraram reprodutíveis e comparáveis àqueles obtidos pelos procedimentos (a) e (b).

d) Desproteíntização com ácido tri-cloro-acético

O ácido tri-cloro-acético (TCA) é um ácido carboxílico obtido pela halogenação dos ácidos alifáticos na posição α . É um agente desproteíntizante muito usado nos Laboratórios de Análises Clínicas, pois seu uso é caracterizado pela precipitação das proteínas presentes no soro sanguíneo humano, principalmente a albumina. Os resultados evidenciam que com a presença de TCA, na concentração empregada, os valores obtidos para Zn foram muito superiores àqueles encontrados para o procedimento de diluição. Este fato é considerado um problema analítico quando se determina Zn sob tais condições uma vez que podem ter ocorrido erros relacionados ao volume de amostra e interferências não específicas nos processos de nebulização e atomização dos analitos no FAAS. Portanto, para a determinação deste metal este método torna-se inviável, frente à precisão dos procedimentos de diluição, por outro lado, para a determinação de Cu, esta metodologia pode ser aplicada quando comparada com os outros procedimentos.

DISCUSSÃO

Quatro procedimentos foram testados para a determinação de Cu e Zn em soro sanguíneo humano em condições comparáveis. Na avaliação individual dos procedimentos de pré-tratamento de soro sanguíneo, evidenciou-se uma pequena diferença entre eles. Os resultados permitem concluir que o uso da diluição com água desionizada e com agentes surfactantes, tais como, Triton X-100 e CTAB podem melhorar as condições para a determinação destes metais, pois permitem maiores fatores de diluição e não necessitam de compatibilização de matriz. O tratamento com exposição ao ultra-som também é uma alternativa viável para a realização das análises. A análise dos dados obtidos permitiu concluir que todos os procedimentos propostos são viáveis para a determinação de Cu em soro sanguíneo humano, uma vez que os resultados foram comparados e avaliados e

verificou-se que não há diferença significativa entre os resultados, com nível de significância de 95%.

Os resultados com o uso de TCA não foram satisfatórios para a determinação de Zn uma vez que apresentou resultados elevados para a determinação de zinco, o que indica uma possível contaminação e/ou interferências não-específicas. Logo, este procedimento não é viável para a determinação de Zn em soro sanguíneo humano.

REFERÊNCIAS

1. Burch, R.E.; Hahn, H.K.; Sullivan, J.F. Newer aspects of the roles of zinc, manganese and copper in human nutrition. *Clin. Chem.*, 21(4): 501-520, 1975.
2. Wouwe, J.P.V. Clinical and laboratory assessment of zinc deficiency in dutch children. *Biol. Trace Elem. Res.*, 49: 211-215, 1995.
3. Cappuis, P. A. Sequential and Simple Determination of Zinc, Copper and Aluminum in Blood Samples by Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, 206, 155-165 (1992).
4. Sargentelli, V.; Mauro, A.E.; Massabi, A.C. Aspectos do metabolismo do cobre no homem. *Quim. Nova.*, 19(3): 290-293, 1996.
5. Tsalev, D.L. *Atomic Absorption Spectrometry in Occupational and Environmental Health Practice*. vol. II. CRC Press: USA, 1984.
6. Prasad, A. S.; Oberleas, D. *Trace Elements in Human Health and Disease*. vol. I. Academic Press: New York, 1976.
7. Paschal, D.C. Biological Monitoring with atomic spectrometry. *Spectrochim. Acta.*, 44B(12): 1229-1236, 1989.
8. Pavón, J.M.C.; Pozo, M.E.U.; Torres, A. G. Determination of traces of zinc in biological materials, wine and alloys by fluorometry. *Anal. Chem.*, 58: 1449-1451, 1986.
9. White, M. A.; Panayi, A. Simultaneous Multielement AAS determination of trace elements in human body fluids to establish reference values for European populations. *At. Spectrosc.*, 19(3): 89-94, 1998.
10. Subramanian, K. S. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. *Spectrochim. Acta Part B*, 51: 291-319, 1996.
11. Ericson, S. P.; McHalsky, M.L.; Rabinow, K.G.K.; Arceo, C.S.; Weltzer, J. A. Ayd, S.W. Sampling and Analysis techniques for monitoring serum for trace elements. *Clin. Chem.*, 32(7): 1350-1356, 1986.
12. Santos Junior, A. F.; Korn, M.G.A.; Jaeger, H.V.; Silva, N.M.S.; Costa, A.C.S. Determinação de Mn, Cu e Zn em Matrizes Salinas após Separação e Pré-concentração Usando Amberlite XAD-7 Impregnada com Vermelho de Alizarina S. *Quim. Nova*, 25(6B): 1086-1090, 2002.
13. Chan, K.M.; Ladenson, J.H. Sample viscosity can be a source of analytical error when discrete sampler-dilutors are used. *Clin. Chem.*, 27(11): 1896-1898, 1981.
14. Cornelis, R.; Kimpe, J.; Zhang, X. Trace elements in clinical samples revisited - speciation is knocking at the door. Sample preparation, separation of the species and measurements methods. *Spectrochim. Acta Part B*, 53: 187-196, 1998.
15. Bermejo-Barrera, P.; Gonzalez, R.D.; Ferreiro, R.S.; Bermejo-Barrera, A. Use of the surfactant agents in the direct determination of zinc in milk samples by flame atomic absorption spectrometry. *Analisis*, 23: 135-136, 1995.
16. Meier, P. C.; Zund, R. E. *Chemical Analysis - Statistical Methods in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Inc.: New York, 1993.
17. ÉI'Piner, I.E. *Ultrasound Physical, Chemical and Biological Effects*. Consultants Bureau: New York, 1964.

Endereço para correspondência

Prof. Aníbal de Freitas Santos Júnior
Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS
Departamento de Saúde - Ciências Farmacêuticas
BR 116, Km 03, Av. Universitária - CEP: 44031-460
Feira de Santana - Bahia
E-mail: bal@uefs.br

Congresso internacional de 2008

As inscrições para o Congresso Internacional de Análises Clínicas da IFCC, em outubro de 2008, em Fortaleza, já podem ser feitas. O valor da inscrição é de U\$ 200.00 (duzentos dólares), que podem ser parcelados em até 4 vezes, sendo que a última parcela deverá ser quitada até setembro de 2008. Outras informações podem ser obtidas na SBAC, através do telefone (0xx21) 2264-4449.

Variação interobservador no diagnóstico das lesões escamosas intra-epiteliais cervicais*

Interobserver variability in the diagnosis of cervical squamous intraepithelial lesions

Mirian Pereira Rodarte¹ & Paula Ávila Fernandes²

RESUMO – Empregou-se um dos métodos de controle da qualidade em citologia cérvico-vaginal através do estudo da variação interobservador nos diagnósticos citológicos de lesões escamosas intraepiteliais. Trinta e nove esfregaços cérvico-vaginais provenientes de um único laboratório de anatomia patológica foram revisados por 5 observadores. Estes esfregaços representavam 20 casos de lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LEIBG) e 19 casos de lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (LEIAG). Houve concordância entre os 5 observadores em 10% dos casos revisados e entre três ou mais observadores em 72% dos casos. O grau de concordância foi maior em LEIBG (15%) do que em LEIAG (5%). O maior grau de concordância entre dois observadores em nosso estudo, tanto para os casos de LEIBG (75%) como para os casos de LEIAG (58%) ocorreu entre um observador mais experiente e outro observador treinado por ele. As alterações citológicas compatíveis com infecção pelo HPV foram relatadas pelos 5 observadores em 31% dos esfregaços com diagnóstico original de infecção pelo HPV e pela maioria em 85%.

PALAVRAS-CHAVE – Controle da qualidade, citologia cervical, lesão escamosa intraepitelial, HPV.

SUMMARY – One of the methods of quality control in cervicovaginal cytology were chosen by studying the interobserver variability on the cytological diagnosis of squamous intraepithelial lesion. Thirty nine cervicovaginal smears from a single pathological anatomy laboratory have been reviewed by 5 observers. These smears represented 20 cases of low grade squamous intraepithelial lesion (LSIL) and 19 cases of high grade squamous intraepithelial lesion (HSIL). The agreement among the 5 observers were 10% in the reviewed cases and among three or more observers in 72% of the cases. The agreement level was higher in LSIL (15%) than in HSIL (5%). The highest level of agreement between two observers in our study, as well for the cases of LSIL (75%) as for the HSIL ones (58%), has occurred between a more skilful observer and another observer trained by him. The cytological alteration compatible with HPV infection were reported by five observers in 31% of the smears with original diagnosis of HPV infection and by the majority in 85%.

KEYWORDS – Quality control, cervical cytology, squamous intraepithelial lesion, HPV.

INTRODUÇÃO

A citologia cérvico-vaginal, representada pelo exame preventivo de Papanicolaou, é um método efetivo de prevenção do câncer de colo uterino, sendo de fácil execução e baixo custo (Montanari & Stefanon, 1993). No entanto, mesmo com a realização do exame preventivo, os casos de neoplasia não são eliminados. Um pequeno número de mulheres desenvolve rapidamente uma neoplasia cervical independente do *screening*, mas a maioria deve-se a erro na amostragem e/ou erro na execução do exame (Henry & Wadehra, 1996; Mubiayi *et al.*, 2002). O controle da qualidade é o melhor caminho para reduzir os erros de *screening* e amostragem (Van Der Graaf *et al.*, 1987; Renshaw, 2001). Este controle pode ser feito através de instituições que vão estabelecer a comparação entre os diagnósticos - controle da qualidade externo e/ou em cada laboratório - controle da qualidade interno (Cocchi *et al.*, 1996). Uma das formas de controle da qualidade externo consiste na avaliação de concordância dos diagnósticos (Montanari & Stefanon, 1993; Colgan *et al.*, 2001), onde são analisadas as variações inter e/ou intra-observadores. O controle da qualidade interno pode ser realizado através de alguns procedimentos como:

avaliação da qualidade da amostra, número máximo de exames diários, revisão de exames prévios da paciente, levantamento de casos positivos e negativos, correlação clínico-citológica e correlação cito-histológica.

Pretende-se neste trabalho analisar a variação interobservador no diagnóstico das lesões escamosas intra-epiteliais do colo uterino e da infecção pelo HPV, através do grau de concordância entre 5 observadores.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 39 esfregaços cérvico-vaginais de um único laboratório de anatomia patológica, já corados pelo método de Papanicolaou. Estes esfregaços representavam casos com os seguintes diagnósticos: displasia leve, displasia moderada, displasia acentuada e carcinoma *in situ*, associados ou não a alterações citológicas compatíveis com infecção pelo HPV. Todos os diagnósticos originais foram dados pelo mesmo citopatologista, que possui tempo de experiência superior a 10 anos, utilizando a nomenclatura de Reagan associada à nomenclatura proposta pelo sistema Bethesda (Reagan *et al.*, 1953; Kurman & Solomon, 1994, Solomon *et al.*, 2002).

Os diagnósticos e números originais foram registrados. A seguir, ganharam uma nova numeração e foram

Recebido em 14/8/2003

Aprovado em 28/8/2003

*Trabalho realizado em Lab. de Citopatologia de BH e na Disciplina de Citologia Clín. do Dept^o de Análises Clínicas e Toxicológicas da Fac. de Farmácia da UFMG

¹Farmacêutica-Bioquímica, especialista em Citopatologia

²Professora da Disciplina de Citologia Clínica - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - Faculdade de Farmácia - UFMG

encaminhados para serem analisados por 5 citologistas que não trabalham no laboratório onde foram selecionados os casos. Por esta razão os diagnósticos originais não estavam disponíveis aos observadores que participaram deste estudo. Para a escolha destes observadores foram considerados as diferentes formações profissionais e o tempo de atuação na área de colpocitopatologia. Os esfregaços encaminhados aos observadores não apresentavam campos marcados. Os observadores foram informados que os esfregaços foram diagnosticados originalmente como lesão escamosa intra-epitelial cervical, porém, não tiveram acesso às requisições originais e aos resultados dos exames anteriores das pacientes.

Os observadores identificados neste estudo como A, B e C possuem mais de 10 anos de experiência, o observador D possui de 5 a 10 anos e o observador E menos de 5 anos. Os observadores C e D trabalham no mesmo laboratório de colpocitopatologia, sendo que o observador D foi treinado pelo observador C. Os outros observadores trabalham em laboratórios diferentes. Para cada observador, foram sugeridas as seguintes possibilidades diagnósticas: esfregaço inadequado, alterações *borderline* em células escamosas e/ou glandulares, displasia leve, displasia moderada, displasia acentuada, carcinoma *in situ* e a categoria "outros". Os casos contendo alterações citológicas compatíveis com infecção pelo HPV deveriam ser relatados.

RESULTADOS

A maioria dos resultados apresentados pelos observadores não foram expressos de forma homogênea, dentro de uma mesma classificação. Foram relatados de acordo com a nomenclatura proposta pela classificação Bethesda e/ou pela classificação de Richart e/ou Reagan (Reagan *et al.*, 1953; Richart, 1966), prejudicando nossa análise quanto ao grau de concordância entre os diagnósticos. Para facilitar a análise dos dados e adequação à nomenclatura vigente, todos os resultados foram convertidos para a nomenclatura da classificação Bethesda. Desta forma, os casos analisados no presente trabalho foram representados por 20 casos de lesão escamosa intra-epitelial de baixo grau (LEIBG) e 19 casos de lesão escamosa intra-epitelial de alto grau (LEIAG), sendo que 13 deles apresentavam alterações citológicas compatíveis com infecção pelo HPV. Os casos de displasia leve, associados ou não ao HPV, foram agrupados na categoria de LEIBG, enquanto que os esfregaços com diagnóstico de displasia moderada, displasia acentuada e carcinoma *in situ*, associados ou não ao HPV, foram agrupados na categoria de LEIAG.

Para os casos previamente diagnosticados como LEIBG houve concordância entre os 5 observadores em 15% dos casos. Entre 4 ou mais observadores, a concordância foi observada em 65% e entre três ou mais observadores em 75%. Para os casos previamente diagnosticados como LEIAG, houve concordância entre os 5 observadores em 5%. Entre 4 ou mais, a concordância foi de 21% e entre três ou mais observadores em 68%, conforme mostra a Tabela I. O maior grau de concordância entre dois observadores para os casos com diagnóstico prévio de LEIBG ocorreu entre os observadores C e D: 75%, e o menor grau de concordância entre os observadores C e E: 30%. Com relação ao diagnóstico original (LEIBG), o maior grau de concordância ocor-

TABELA I
Grau de concordância (%) entre os observadores

Número de observadores	Diagnóstico citológico		
	LEIBG	LEIAG	HPV
5	15%	5%	31%
>4	65%	21%	62%
>3	75%	68%	85%

TABELA II
Frequência (%) de cada categoria diagnóstica relatada pelos 5 observadores nos 39 esfregaços cervicais revisados

Observadores	Tempo de experiência dos observadores	Diagnóstico citológico					
		INAD	NEG	LEIBG	LEIAG	INV	ASCUS/AGUS
A	>10 anos	5	38	44	10	0	3
B	>10 anos	3	18	28	23	18	10
C	>10 anos	8	21	44	10	0	18
D	5-10 anos	0	18	56	18	0	8
E	<5 anos	0	0	46	54	0	0
Diagnóstico original	>10 anos	0	0	51	49	0	0

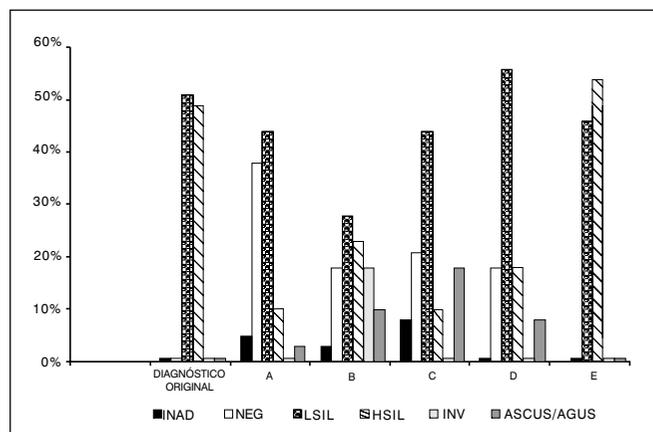


FIG. 1 - Revisão pelos 5 observadores dos esfregaços originalmente diagnosticados como lesão escamosa intra-epitelial.

reu com o observador E: 70% e o menor grau com os observadores A e B: 8 casos (40%). O maior grau de concordância entre dois observadores para os casos com diagnóstico prévio de LEIAG foi entre os observadores C e D: 58% e o menor grau entre os observadores A e B: 16%. Com relação ao diagnóstico original (LEIAG), o maior grau de concordância ocorreu com o observador E: 79% e o menor grau com os observadores A e C: 21%.

Em 8 dos 13 casos em que houve concordância entre três ou mais observadores, a concordância dos observadores foi em relação ao diagnóstico de LEIBG, contrariamente ao diagnóstico original de LEIAG.

A Tabela II e a Fig. 1 mostram a frequência, em percentagem, de cada categoria diagnóstica relatada pelos 5 observadores nos 39 esfregaços cervicais revisados. A Tabela II mostra também o tempo de experiência em citopatologia de cada observador. O diagnóstico de LEIBG pelos 5 observadores variou de 28% a 56%, enquanto que a variação dos diagnósticos nos casos de LEIAG foi de 10% a 54%.

Considerando as 5 categorias diagnosticadas pelos observadores (casos negativos, células escamosas atí-

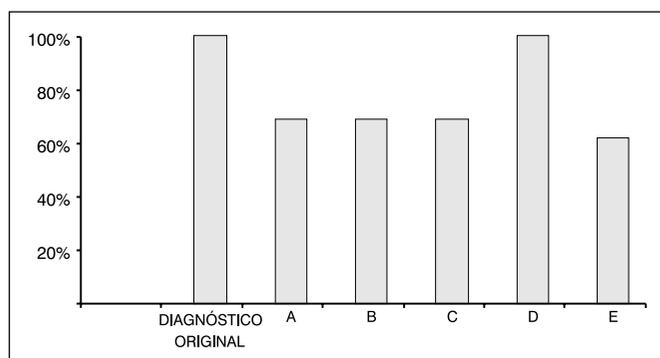


FIG. 2 - Casos de infecção pelo HPV relatados por cada observador em concordância com o diagnóstico original.

picas de significado indeterminado - ASCUS, LEIBG, LEIAG e carcinoma invasor), e excluindo-se a categoria de esfregaços classificados como inadequados, verificamos que para os casos de LEIBG houve uma variação maior ou igual a dois graus em 60% dos casos e para os casos de LEIAG em 53% dos casos.

Para os 13 casos que originalmente tiveram o diagnóstico de alterações citológicas compatíveis com infecção pelo HPV associadas ao diagnóstico de lesão escamosa intra-epitelial, houve concordância entre os 5 observadores em 4 casos (31%), entre 4 ou mais observadores em 8 casos (62%) e entre três ou mais observadores em 11 casos (85%), conforme Tab. I. A Fig. 2 ilustra a frequência que cada observador concordou com o diagnóstico original de infecção por HPV.

DISCUSSÃO

Vários programas de controle da qualidade externo são difundidos nas áreas de patologia e citologia. A concordância entre os observadores utilizando estes programas é questionada por alguns autores porque os esfregaços-testes são identificados e portanto, avaliados com mais cuidado que as amostras de rotina. Além disso, a interrelação entre o observador e supervisor pode ter sido alterada e a utilização de classificações simplificadas podem superestimar a concordância entre os observadores (Cocchi *et al.*, 1996). O estudo da variação interobservador realizado neste trabalho foi retrospectivo. Foram selecionados esfregaços mais recentes e já corados. Não trabalhamos com os resultados dos exames anatomopatológicos, uma vez que o número de casos que apresentavam biópsia era muito pequeno. Além disso, não era nosso objetivo correlacionar o diagnóstico cito-histopatológico, nem mesmo confirmar o diagnóstico citológico previamente relatado.

O grau de concordância interobservadores neste estudo foi maior em lesões escamosas intra-epiteliais com diagnóstico original de LEIBG que em LEIAG, 15% e 5% respectivamente, diferentemente do que foi relatado por alguns autores, que justificam a menor reprodutibilidade em casos de LEIBG devido ao menor número de células anormais presentes nos esfregaços (Joste *et al.*, 1996). Houve concordância entre os 5 observadores em apenas 4 dos 39 casos examinados (10%) e a maioria concordou em 28 dos 39 casos (72%). Este percentual é inferior ao relatado por Joste *et al.* (1996), onde o diagnóstico unânime foi obtido em 56% dos casos e a maioria concordou em 89% dos casos.

A concordância interobservador é fortemente influen-

ciada pela experiência dos observadores (Klinkhamer *et al.*, 1988). Dos 28 casos em que houve concordância diagnóstica entre a maioria, o observador D (5-10 anos de experiência) concordou em 27 casos, o observador A (>10 anos de experiência) em 23 casos, o observador C (>10 anos de experiência) em 21 casos, os observadores B (>10 anos de experiência) e E (<5 anos de experiência) em 17 casos. O observador E, com o menor tempo de experiência, foi um dos observadores com menor número de casos em concordância com a maioria. Ao analisarmos como foram diagnosticados os 39 esfregaços revisados, o observador E foi o único que utilizou apenas duas categorias diagnósticas: LEIBG e LEIAG, não considerando nenhum caso como negativo ou ASCUS. Além disso, foi o observador que mais diagnosticou LEIAG nos casos de LEIBG.

Genest *et al.* (1993) relatou alto grau de concordância entre o observador mais experiente e outro observador treinado por ele. O maior grau de concordância entre dois observadores em nosso estudo, tanto para os casos de LEIBG (75%) como para os casos de LEIAG (58%), foi entre os observadores C e D. Estes observadores trabalham em um mesmo serviço de colpocitopatologia, sendo que o observador D foi treinado pelo C.

A concordância entre os 5 observadores nos 13 casos originalmente apresentando alterações citológicas compatíveis com infecção pelo HPV foi baixa (31%), porém a maioria concordou em 85% dos casos. Schneider *et al.* (1987) relataram um aumento no número de casos de HPV diagnosticados pela citologia, utilizando os sinais não clássicos, tais como coilocitose leve, disceratose leve, clareamento do citoplasma, bi ou multinucleação, entre outros. Com o uso dos sinais clássicos (coilocitose e disceratose), 15% dos esfregaços em que o DNA-HPV era positivo foram detectados pelo exame citológico. Ao considerar os sinais não clássicos, 85% destes foram detectados. A utilização ou não dos sinais citológicos não clássicos pelos observadores para o diagnóstico da infecção pelo HPV poderia ser um dos fatores para explicar a baixa concordância entre os cinco observadores para este diagnóstico. Alguns autores recomendam que estes sinais nos esfregaços citológicos deveriam ser uma indicação para selecionar pacientes a serem avaliadas por técnicas mais sensíveis, como por exemplo o exame anatomopatológico (Cecchini *et al.*, 1989; Cavalcanti *et al.*, 1987; Cramer *et al.*, 1997).

A qualidade dos esfregaços é muito importante para interpretação correta das alterações celulares (Rubio, 1981; Klinkhamer *et al.*, 1989). Houve observações quanto à qualidade técnica das lâminas em 16 casos (41%) dos 39 casos revisados. No entanto, é pouco provável que os artefatos relatados interferiram nos diagnósticos citológicos, uma vez que houve concordância pela maioria dos observadores em 10 (63%) dos 16 esfregaços com artefatos. Dos 5 esfregaços considerados inadequados, em três houve concordância diagnóstica pela maioria dos observadores.

A precisão diagnóstica variou sensivelmente entre os observadores. Para os casos de LEIBG houve uma variação maior ou igual a dois graus em 60% dos casos, enquanto que para os casos de LEIAG, a variação foi de 53%.

Diante destes resultados, ressaltamos a importância da realização de métodos de controle da qualidade para garantirmos a eficiência da prevenção do câncer de colo uterino.

REFERÊNCIAS

1. **Cavalvanti, S.M.B.; Zardo, L.G.; Oliveira, L.H.S.** Human Papillomavirus Infection: Correlation of colposcopy, cytology, histopathology and in situ hybridization. *J. Bras. Patol.*, v. 33, p. 62-69, 1997.
2. **Cecchini, S.; Confortini, M.; Bonardi, L.; Cipparrone, G.; Galante, L.L.; Iossa, A.; Ciatto, S.** "Nonclassic" cytologic signs of cervical condyloma. Case control study. *Acta Cytol.*, v. 90, p. 781-785, 1989.
3. **Cocchi, V.; Sintoni, C.; Carreti, D.; Sama, D.; Chiari, U.; Segala, V.; Delazer, A.L.; Grilli, N.; Papaleo, R.; Ghirardini, C.; Bucchi, L.** External quality assurance in cervical/vaginal cytology: Interlaboratory agreement in Emilia-Romagna region of Italy. *Acta Cytol.*, v. 40, p. 480-488, 1996.
4. **Colgan, T.G.; Woodhouse, S. L.; Styer, P. E.; Kennedy, M.; Darcy, D.D.** Reparative changes and the false-positive/false negative Papanicolaou test: a study from the College of American Pathologists. Interlaboratory comparison Program in cervicovaginal. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, v.125(1): p.134-140, 2001.
5. **Cramer, H.M.; Skinner-Wannemuehler, S.E.; Brown, D.R.; Katz, B.P.; Fife, K.H.** Cytomorphologic correlates of Human Papillomavirus infection in the "normal" cervicovaginal smear. *Acta Cytol.*, v. 41, p. 261-268, 1997.
6. **Genest, D.R.; Stein, L.; Cibas, E.; Sheets, E.; Zitz, J.C.; Crum, C.P.** A binary (Bethesda) system for classifying cervical cancer precursor: criteria, reproducibility, and viral correlates. *Hum. Pathol.*, v. 24, p. 730-736, 1993.
7. **Henry, J.A.; Wadehra, V.** Influence of smear quality on the detecting significant cervical cytological abnormalities. *Acta Cytol.*, v. 40, p. 529-535, 1996.
8. **Joste, N.E.; Rushing, L.; Granados, R.; Zitz, J.C.; Genest, D.R.; Crum, C.P.; Cibas, E.S.** Bethesda classification of cervicovaginal smears: reproducibility and viral correlates. *Hum. Pathol.*, v. 27, p. 581-585, 1996.
9. **Klinkhamer, P.J.J.M.; Vooijs, G.P.; Haan, A.F.J.** Intraobserver and interobserver variability in the diagnosis of epithelial abnormalities in cervical smears. *Acta Cytol.*, v. 32, p. 794-800, 1988.
10. **Klinkhamer, P.J.J.M.; Vooijs, G.P.; Haan, A.F.J.** Intraobserver and interobserver variability in the quality assessment of cervical smears. *Acta Cytol.*, v. 33, p. 215-218, 1989.
11. **Kurman, R.J.; Solomon, D.** *The Bethesda system for reporting cervical/vaginal cytologic diagnoses. Definitions, criteria and explanatory notes for terminology and specimen adequacy.* New York: Springer Verlag, 1994. 81 p.
12. **Montanari, G.R.; Stefanon, B.** Exame citológico e biópsia. In: **De Palo, G.** *Colposcopia e Patologia do trato genital inferior.* Trad. Maria Inês M. Fabricio e Rachele M. Santoro. Rio de Janeiro: Médica e Científica, 1993. p. 27-35. (original italiano).
13. **Mubiayi N., Bogaret, E., Boman F., Leblanc, E., Vinatier, D., Leroy, I. L., Querleu, D.** Cytological history of 148 women presenting with invasive cervical cancer. *Gynecol. Obstet. Fertil.*, v. 30(3), p.210-217, 2002.
14. **Reagan, J.W.; Seidmann, I.L.; Saracusa, Y.** The cellular morphology of carcinoma *in situ* and dysplasia or atypical hiperplasia of uterine cervix, *Cancer*, v. 6, p. 224-235, 1953.
15. **Renshaw, A. A.** An accurate and precise methodology for routine determination of the false-negative rate of Papanicolaou smear screening. *Cancer*, v.93(2), p.86-92, 2001.
16. **Richart, R.M.** The influence of diagnostic and therapeutic procedures on the distribution the of cervical intraepithelial neoplasia. *Cancer*, v.19, p.1635-1638, 1966.
17. **Rubio, C.A.** False negatives in cervical cytology: can they be avoided? *Acta Cytol.*, v. 25, p. 199-202, 1981.
18. **Schneider, A.; Meinhardt, G.; De-Villiers, E.; Gissmann, L.** Sensivity of the cytologic diagnosis of cervical condyloma in comparison with HPV-DNA hybridization studies. *Diag. Citopathol.*, v. 3, p. 250-255, 1987.
19. **Solomon, D., Davey, D., Kurman, R., Moriarty, A., O Connor, D., Prey, M., Raab, S., Sherman, M., Wilbur, D., Wilbur, T., Wright, T., Young, N.** The 2001 Bethesda System Terminology for Reporting Results of Cervical Cytology. *JAMA*, v.287, n.16, 2002.
20. **Van Der Graaf, Y.; Vooijs, G.P.; Gaillard, H.L.J.; Go, D.M.D.S.** Screening errors in cervical cytologic. *Acta Cytol.*, v. 31, p. 434-438, 1987.

Endereço para correspondência
Profª Mirian Pereira Rodarte
Praça João Arbex, 85/102 - Centro
37200-000 - Lavras, MG
E-mail: mpr@uflanet.com.br

Oportunidade aos professores de análises clínicas

A Sociedade Brasileira de Análises Clínicas – SBAC, é uma sociedade científica que tem por finalidade congregar profissionais analistas clínicos de diferentes formações profissionais.

Os professores de Análises Clínicas não têm entidade constituída, (o que não acontece com outras profissões liberais) onde possam se reunir, discutir os assuntos sobre ensino e, principalmente, apresentar as reivindicações necessárias ao adequado desenvolvimento profissional.

A SBAC é a sociedade que pode congrega esta classe e servir como fórum de discussões e reivindicações. Além desta possibilidade, oferece aos associados, a Revista Brasileira de Análises Clínicas – RBAC, indexada, (ISSN 0370-369x e LILACS) com divulgação internacional, periodicidade trimestral, voltada à divulgação de trabalhos científicos de pesquisa e o SBAC Jornal (40.000 exemplares), com temas de atualização, reciclagem profissional e informações gerais sobre a Sociedade e produtos de laboratório.

Descontos especiais são oferecidos habitualmente na inscrição para os congressos brasileiros, além de premiação para os melhores trabalhos (temas livres) desenvolvidos em diversas áreas e cuja regulamentação encontra-se divulgada na Revista Brasileira de Análises Clínicas.

Perfil de resistência aos antimicrobianos de *Pseudomonas* isoladas no Hospital Geral de Fortaleza

Antimicrobials profile resistance from isolated *Pseudomonas* at the Fortaleza's General Hospital

Everardo Albuquerque Menezes¹; Liana Albuquerque Silveira¹; Francisco Afrânio Cunha¹; Márcio de Souza Cavalcante¹; Andréa Bessa Teixeira¹; Inácio Régis Nascimento Oliveira² & Maria Núbia Cavalcante Salviano²

RESUMO – O objetivo deste trabalho foi avaliar a resistência das *Pseudomonas* isoladas de pacientes internados no Hospital Geral de Fortaleza, na cidade de Fortaleza. No período de 1 de janeiro a 30 de junho de 2001, foram isoladas 700 bactérias, no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza, as cepas foram isoladas em placas de ágar sangue, ágar MacConkey, ágar CLED e caldo BHI e identificadas pelo sistema Walkway e também os Testes de Susceptibilidade aos Antimicrobianos. Das 700 cepas isoladas 79 (11,28%) foram *Pseudomonas* e destas 64 cepas (81%) foram *Pseudomonas aeruginosa*. A urina e o aspirado traqueal foram as amostras em que ocorreram as maiores freqüências de isolamento, com 30 cepas (37,97%) e 22 cepas (27,8%) respectivamente. Em relação à resistência e a sensibilidade das bactérias isoladas a Piperacilina/Tazobactam foi o antimicrobiano mais sensível e a Tetraciclina, o mais resistente. Quanto à procedência das amostras a UTI foi o setor que teve maior freqüência de cepas isoladas com 25,31%, seguido da UTU (Unidade de tratamento de urgência) com 21,51%.

PALAVRAS-CHAVE – *Pseudomonas*, antimicrobianos, UTI, urina, aspirado traqueal.

SUMMARY – From January, 1st to June, 30th, 2001, a study evaluates the resistance of isolated *Pseudomonas* from patients at Fortaleza's General Hospital, when were isolated 700 bacteria in the Clinical Pathology Laboratory. The strains were isolated in Petri dish blood agar, CLED agar, MacConkey agar and BHI broth. The bacteria were identified through the Walkway system as well by the susceptibility antimicrobials tests. From the 700 strains isolated, 79 (11.28%) were *Pseudomonas* sp. and 64 strains (81%) were *Pseudomonas aeruginosa*. The urine and windpipe aspirate were the samples with higher isolated frequency, 37.97% (30) and 27.8% (22), respectively. To the resistance and the susceptibility of the isolated bacteria, the Piperacilin/Tazobactam were the most susceptible and Tetraciclín, the most resistant, with 83.6%. From the origin samples, the UTI presented higher frequency with 25.31%, following by the UTU (Urgency Treatment Unity), with 21.51%.

KEYWORDS – *Pseudomonas*, antimicrobials, UTI, urine, windpipe aspirate.

INTRODUÇÃO

As *Pseudomonas* são organismos ubíquos, encontrados no solo, matéria orgânica em decomposição, vegetação e água. Também são encontrados em todo ambiente hospitalar em reservatórios úmidos, como alimento, flores cortadas, pias, sanitários, esfregões para o chão, equipamento de tratamento respiratório e até mesmo em soluções de desinfetantes. São bacilos Gram negativos retos ou ligeiramente curvos, móveis através de flagelos polares, normalmente aeróbios, mas que podem crescer anaerobicamente (Murray *et al.*, 2000).

A grande maioria das infecções respiratórias causadas por *Pseudomonas aeruginosa* adquirida por infecção hospitalar é reflexo da saúde do organismo e da capacidade de aproveitar o colapso da defesa antimicrobiana humana. A mortalidade por *P. aeruginosa* continua acima de 60%, não sendo melhor do que há 25

anos, apesar do fato de que hoje se tem um número maior de antibióticos mais potentes (Beltrame *et al.*, 2000).

As *Pseudomonas* são, fundamentalmente, patógenos oportunistas que causam infecções em pacientes hospitalizados, podendo causar infecções em qualquer parte do corpo, mas, as infecções do trato urinário, pneumonias e infecções em ferimentos, predominam. Do sítio de infecção, a bactéria pode penetrar na corrente sanguínea, causando septicemia. Pacientes com septicemia causada por *Pseudomonas aeruginosa* têm taxa de mortalidade acima de 50% (Koneman, *et al.*, 2001).

As *Pseudomonas* são bactérias clinicamente importantes por causa de sua resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos. O desenvolvimento de cepas resistentes aos antibióticos se dá por mutação genética natural ou induzida e elas desenvolvem diversos mecanismos de inibição da atividade dos antimicrobianos (Tavares, 1996).

O uso de antibióticos induz a uma pressão seletiva

Recebido em 11/4/2003

Aprovado em 14/5/2003

* Trabalho realizado no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza - SUS

¹ Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará

² Farmacêutico Bioquímico do Hospital Geral de Fortaleza - SUS

sobre as cepas bacterianas, favorecendo a preservação das cepas que sofrem mutação genética para a resistência em relação às cepas sensíveis. A disseminação desses agentes, ocorre particularmente quando as medidas básicas no controle das infecções hospitalares não são respeitadas (Padoveze *et al.*,2000).

Normalmente, a transmissão de bactérias multirresistentes se dá de maneira cruzada, através dos profissionais de saúde, tanto pelo contato direto entre um paciente e outro, como pelo contato indireto devido o manuseio de artigos ou superfícies contaminadas. Mais raramente pode ocorrer transmissão por uma fonte única diretamente de artigos ou equipamento contaminado (Padoveze *et al.*,2000).

As cepas de bactérias resistentes a múltiplos antibióticos não apresentam maior potencial de transmissibilidade ou virulência quando comparada as cepas sensíveis, entretanto, as infecções devidas as agentes multirresistentes apresentam opção terapêutica restrita. (Padoveze *et al.*,2000). A *Pseudomonas aeruginosa* é conhecida por ser resistente à maioria dos antibióticos em uso, no entanto, mais recentemente novos antibióticos estão mostrando uma boa ação contra este patógeno (Tavares, 1996).

Considerando a alta resistência das pseudomonas no ambiente hospitalar resolveu-se fazer um estudo destas cepas no Hospital Geral de Fortaleza, Hospital da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram isoladas 700 bactérias no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza no período de 1º de janeiro a 30 de junho de 2001, realizados pelo setor de Microbiologia.

As amostras coletadas para a realização das culturas foram: aspirado traqueal; sangue, cateter vascular, ferida cirúrgica, urina, dreno, lavado brônquico, lesão cutânea, secreções (ocular, de ouvido, vaginal, biliar, abdominal e de abscesso).

As amostras de pseudomonas foram isoladas em placas de ágar sangue, ágar CLED, caldo BHI e ágar MacConkey. A identificação das pseudomonas foi feita através do sistema de automação Walkway - Microscan.

Para os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foi utilizado também o sistema Walkway. Os antimicrobianos utilizados foram: amicacina, cefepime, cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxona, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, lomefloxacina, ofloxacina, piperacilina/tazobactam, piperacilina, tetraciclina, tobramicina, trimetropina/sulfametoxazol, ticarcilina/ác. clavulânico e norfloxacina.

RESULTADOS

No período analisado, foram isoladas 700 cepas de bactérias, sendo 79 (11,28%) de *Pseudomonas* (Fig.1). Dentro desse gênero, a espécie mais isolada foi a *P. aeruginosa*, com 64 cepas (81,0% das pseudomonas).

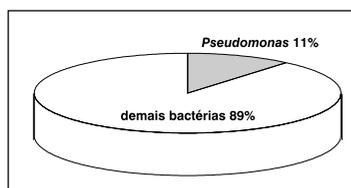


FIG. 1 - Frequência de cepas de *Pseudomonas* isoladas no Hospital Geral de Fortaleza.

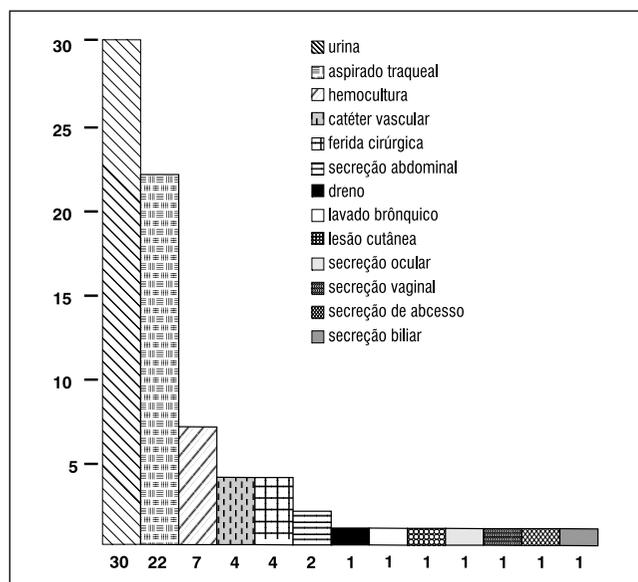


FIG. 2 - Frequência dos espécimes clínicos onde foram isoladas cepas de *Pseudomonas* no Hospital Geral de Fortaleza

TABELA I
Frequência com que os antimicrobianos foram utilizados no teste de susceptibilidade para *Pseudomonas* isoladas e a proporção de cepas sensíveis e resistentes a esses antimicrobianos isolados no Hospital Geral de Fortaleza

Antibióticos	Total de cepas isoladas	Cepas sensíveis		Cepas resistentes	
		Nº	%	Nº	%
Amicacina	79	37	46,8	42	53,2
Cefepima	49	19	36,8	30	61,2
Cefotaxima	49	09	18,4	40	81,6
Ceftazidima	79	35	44,3	44	55,6
Ciprofloxacina	79	30	37,9	49	62,1
Getamicina	79	36	45,5	43	54,4
Ceftriaxona	79	13	16,4	66	83,6
Imipenem	49	22	44,8	27	55,2
Levofloxacina	30	12	40	18	60
Lomefloxacina	30	10	33,3	20	66,7
Ofloxacina	49	17	34,7	32	65,3
Piperacilina/Tazobactam	49	36	73,5	13	26,5
Piperacilina	79	46	58,2	33	41,8
Ticarcilina/Ac.Clavulânico	49	28	57,1	21	42,9
Tobramicina	79	39	49,4	40	50,6
Norfloxacina	30	14	46,7	16	53,3
Tetraciclina	01	0	0	01	100
Trimetropina/Sulfametoxazol	15	08	53,3	07	46,7

A amostra biológica que apresentou maior frequência de *Pseudomonas* foi a urina com 30 (37,97%), de acordo com a Figura 2. Em seguida vem o aspirado traqueal com 22 (27,8%), hemocultura com 7 (8,86%), cateter vascular e ferida cirúrgica com 4 isolados (5,06%), secreção abdominal com duas amostras (2,53%), dreno, lavado brônquico, lesão cutânea, secreção ocular, secreção de ouvido, secreção vaginal, secreção de abscesso e secreção biliar com uma amostra cada (1,2%).

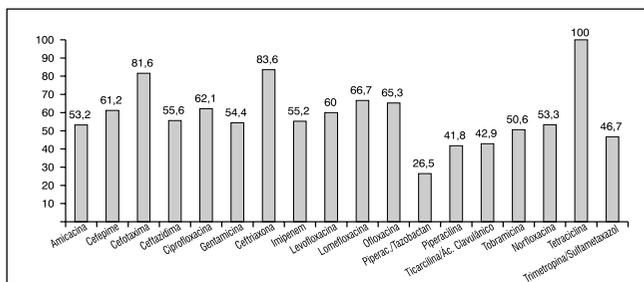


FIG. 3 - Frequência de resistência das pseudomonas isoladas no Hospital Geral de Fortaleza.

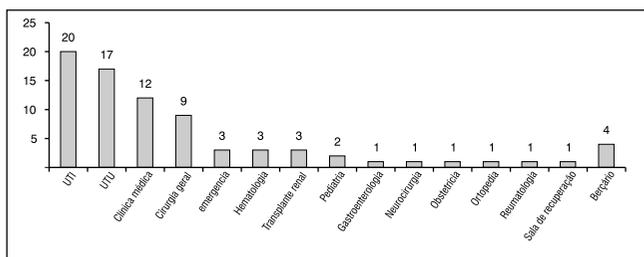


FIG. 4 - Procedência das amostras onde foram isoladas as cepas de Pseudomonas no Hospital Geral de Fortaleza

As 79 *Pseudomonas* isoladas, no período da pesquisa, foram testadas com 18 antimicrobianos. A Tabela mostra o Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos (TSA) e a frequência de resistência e sensibilidade das cepas de *Pseudomonas* isoladas no Hospital Geral de Fortaleza. Foi observado que o antimicrobiano mais sensível foi a Piperacilina/Tazobactam com uma frequência de sensibilidade de 73,5% e o mais resistente foi a tetraciclina com 100% de resistência. A Figura 3 mostra as frequências de resistências dos antimicrobianos usados nesta pesquisa.

Quanto à procedência das amostras, de acordo com a Figura 4, foi observado um isolamento de 20 cepas (25,31%) provenientes da UTI, 17 cepas (21,51%) da UTU (Unidade de Tratamento de Urgência), 12 cepas (15,18%) da clínica médica interna, 9 cepas (11,39%) da cirurgia geral, 4 cepas (5,06%) do berçário, três cepas (3,79%) da emergência, hematologia interna e transplante renal interno, duas cepas (2,53%) da pediatria interna e uma cepa (1,2%) da gastroenterologia, neurocirurgia, obstetrícia interna, ortopedia interna, reumatologia interna e sala de recuperação.

DISCUSSÃO

O gênero *Pseudomonas* possui bactérias que apresentam baixa exigência nutricional e é encontrado em todos locais, inclusive o ambiente hospitalar, promovendo infecções primariamente oportunistas e clinicamente importantes por causa de sua resistência intrínseca a muitos agentes antimicrobianos podendo provocar até morte (Masuda *et al.*, 1995 e Nakae *et al.*, 1999). A *Pseudomonas* pode colonizar equipamentos de terapia respiratória, desinfetantes, pias, água destilada, cateteres venosos centrais, cateteres urinários e pacientes com poucos dias de internação (Trabulsi *et al.*, 1999).

A frequência de cepas de *Pseudomonas* isoladas no Laboratório de Patologia Clínica do Hospital Geral de Fortaleza foi de 11,28% (Fig.1). Menezes *et al.* 2002, estudando 1084 culturas isoladas no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará observaram uma

frequência de 10% de bactérias do gênero *Pseudomonas*. O que condiz com o fato de que a *Pseudomonas*, por ser uma bactéria nosocomial e oportunista, é comumente encontrada em infecções hospitalares. Dentro do gênero, a *Pseudomonas aeruginosa* é a mais comumente encontrada em ambiente hospitalar, segundo Koneman *et al.*, 2001. No nosso estudo foi encontrado 81,0% de *Pseudomonas aeruginosa* e Menezes *et al.*, 2002 encontraram 89,09% de *P. aeruginosa*.

No que se refere às amostras, a urina foi a amostra que apresentou maior frequência de isolamento de cepas de *Pseudomonas*, com 37,97% (Fig. 2); o aspirado traqueal com 27,8%; hemocultura com 8,86%, cateter vascular e ferida cirúrgica com 5,06%, secreção abdominal com 2,53%, dreno, lavado brônquico, lesão cutânea, secreção ocular, de ouvido, vaginal, de abscesso biliar com 1,2%. De acordo com a literatura, o mais comumente isolado é em ponta de cateter, lesão cutânea e secreções de uma maneira em geral. Menezes *et al.* 2002, estudando 110 cepas de *Pseudomonas* isoladas no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará observaram também que a urina foi o espécimen clínico onde houve mais isolamentos de *Pseudomonas*.

Quanto à procedência das amostras, observamos que à UTI, foi o setor que apresentou maior isolamento de cepas de *Pseudomonas*, com 25,31%; a UTU com 21,51%, a clínica médica interna com 15,18%, a cirurgia geral com 11,39%, o berçário com 5,06%, a emergência, hematologia interna, transplante renal interno, com 3,79%, a pediatria interna com 2,53% e a gastroenterologia, neurocirurgia, obstetrícia interna, ortopedia interna, reumatologia interna e sala de recuperação, com 1,2%.

Amicacina

Em relação aos antimicrobianos, observamos uma alta frequência de cepas resistentes. As bactérias foram resistentes à amicacina em 53,2% das cepas testadas (Tabela I). Este antimicrobiano apresenta propriedades que se diferenciam dos demais aminoglicosídeos, por ser quase na sua totalidade resistente à inativação das enzimas produzidas pelas *P. aeruginosa* (Tavares, 1996). Trabalho realizado por Assis *et al.*, 2001 estudando o padrão de resistência de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em laboratórios clínicos de João Pessoa, verificaram uma resistência de 20,2%.

Cefepime

Com relação à cefepime, uma cefalosporina de 4ª geração, as bactérias foram resistentes em 61,2% das cepas estudadas. Assis *et al.*, 2001, observaram uma resistência de 25,3% em João Pessoa e Menezes *et al.*, 2002, no complexo hospitalar da Universidade Federal do Ceará, mostraram uma resistência de 41,8%. Observamos uma maior resistência das cepas isoladas no Hospital Geral de Fortaleza do que as encontradas pelos dois autores citados.

Ceftazidima

Trata-se de uma cefalosporina semi-sintética com elevada potência antimicrobiana contra microrganismos Gram negativos, inclusive a *Pseudomonas aeruginosa*. Possui uma boa estabilidade frente às beta-lactamases produzidas por germes Gram negativos, resis-

tindo as enzimas que hidrolisam as cefalosporinas da primeira e segunda gerações. Ela constitui o mais potente antibiótico beta-lactâmico contra as *P. aeruginosa* (Tavares, 1996). No nosso trabalho observamos uma resistência de 55,6%. Santos Filho *et al.*, 2002, em João Pessoa – Paraíba, observaram uma resistência de apenas 15,2% e Menezes *et al.*, 2002, no Hospital Universitário de Fortaleza, observaram uma resistência de 26,4%, mostrando mais um vez uma maior resistência das nossas cepas.

Ciprofloxacina

A ciprofloxacina é bastante potente contra bactérias Gram negativas, mostrando-se 4 a 8 vezes mais ativa que a norfloxacina contra enterobactérias e *Pseudomonas* (Tavares, 1996). Das 79 cepas isoladas, 49 (62,1%) se mostraram resistentes. Assis *et al.*, 2001, verificaram uma resistência de 28,8%.

Gentamicina

A gentamicina apresenta propriedades antimicrobianas e farmacológicas semelhantes às dos demais aminoglicosídeos, caracterizando-se, porém, por sua atividade sobre a *P. aeruginosa*. A gentamicina se destaca dos aminoglicosídeos primitivos pela sua excelente ação de combate a *P. aeruginosa*, constituindo, na atualidade, um dos antibióticos de escolha para o tratamento de infecções por tal bactéria (Tavares, 1996). Das 79 cepas isoladas, 43 se mostraram resistentes, o que equivale a 54,4%, Menezes *et al.*, 2002, encontraram uma resistência de 37,1%.

Imipenem

O imipenem é antibiótico beta-lactâmico sintético. Sua ação inibe a síntese da parede celular das bactérias em crescimento, provocando a lise osmótica. Ele atravessa os envoltórios celulares bacterianos de maneira mais rápida que os outros antibióticos beta-lactâmicos, fato observado sobretudo nas bactérias Gram negativas, graças à sua habilidade de passar pelos canais porínicos destas bactérias. A resistência pode ser observada na *P. aeruginosa*, estando relacionada, principalmente, à modificações no canal porínico que permite a penetração do antibiótico na célula bacteriana (Tavares, 1996). No nosso trabalho verificamos uma resistência de 54,4%. Santos Filho *et al.*, 2001, observaram uma resistência ao imipenem de 19,7% e Menezes *et al.*, 2002, mostraram uma resistência de *Pseudomonas* no Hospital Universitário de 26,4%. Mais uma vez, podemos verificar que as nossas cepas são mais resistentes, sendo um motivo de preocupação.

Tazobactam/Piperacilina

Esta associação, está indicada particularmente nas infecções causadas por *P. aeruginosa*, *Acinetobacter*, *Proteus*, *E. coli* e outros Gram negativos que acometem o paciente hospitalizado, germes em geral com selecionada resistência aos antibióticos β -lactâmicos (Tavares, 1996). Verificamos que este antimicrobiano foi o que apresentou melhor sensibilidade das cepas isoladas, apenas 13 (26,5%) foram resistentes.

Ticarclina/Ácido Clavulânico

A Ticarclina/Ácido Clavulânico, o ácido clavulânico tem atividade antimicrobiana desprezível, no entanto

quando associado com a ticarclina é capaz de diminuir a concentração inibitória mínima destes antibióticos contra microrganismos produtores de beta - lactamases (Tavares, 1996). Das cepas isoladas, 21 (42,9%) foram resistentes. Assis *et al.*, 2001, observaram em João Pessoa uma resistência de 32,8%.

O principal destaque deste trabalho é mostrar cepas de *Pseudomonas* resistentes aos antimicrobianos que constituem um problema de Saúde Pública, podemos até afirmar que é um problema emergente, com significativas alterações terapêuticas nas infecções hospitalares. Esperamos com este trabalho alertar os profissionais da área de saúde ao uso indevido e indiscriminado de antibióticos, assim como informar a população de uma maneira geral, quanto à importância da realização de uma cultura antes do uso do antibiótico.

CONCLUSÕES

- Das culturas realizadas no Hospital Geral de Fortaleza, 11% eram *Pseudomonas*.
- Dentro desse gênero a *P. aeruginosa* foi a mais isolada com 81%.
- Foram isoladas cepas de *Pseudomonas* principalmente nas amostras de urina e aspirado traqueal.
- Os locais que tiveram maior incidência foram UTU, UTI, e Clínica médica interna.
- Os antimicrobianos mais potentes foram Piperacilina/tazobactam, Piperacilina, Ticarclina/ ac. Clavulânico
- Os antimicrobianos menos potentes são tetraciclina, ceftriaxona, cefotaxima.

REFERÊNCIAS

1. Murray, P.R.; Drew, W.L.; Kobayashi, G.S.; Thompson Jr, J.H. - *Microbiologia Médica*. Rio de Janeiro-RJ: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000.
2. Beltrame, R.E.; Silva, C.R.; Tanaka, I.I.; Sornas, A.M.F. *Pseudomonas aeruginosa - antibioticoterapia e perfil de resistência de cepas isoladas das UTIs dos hospitais da Faculdade de Medicina de Marília* [on line]. Disponível na Internet via <http://www.google.com>. Arquivo capturado em 10 de Junho de 2000.
3. Koneman, E. W.; Allen S. D.; Janda, W. M.; Schreckenberger, P.C.; Winn Jr, W. C. *Color Atlas And Textbook of Diagnostic Microbiology*. Fifth Edition, Philadelphia-New York: Lippincott, 1997.
4. Tavares, Wálter. *Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos*. 2ª Edição, São Paulo-SP: Editora Atheneu Editora, 1996.
5. Padoveze, Maria Clara. Oliveira, Evandro Luís. *Bactérias Multi-Resistentes* [on line]. Disponível na Internet via <http://www.google.com> Arquivo capturado em 10 de Junho de 2000.
6. Nakae, T., Nakajima, A., Ono, T., Saito, K., Yoneyama, H., Resistance to β -Lactam Antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* Due to Interplay between the MexAB-OprM Efflux Pump and β -Lactamase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. v. 43, n. 5, p. 1301-03, 1999.
7. Masuda, N., Sakagawa, E., Okhya, S., Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemoter.* 39:645-649.
8. Trabulsi, L.R.; Aletherum, F.; Gompertz, A. F.; Candeias, J. A. N. *Microbiologia*. 3ª edição, Rio de Janeiro-RJ: Livraria Atheneu Editora, 1999.
9. Menezes, E.A., Ferreira, F.C., Cunha, F. A., Café, V.S. & Moreira, J.L.B. Cepas de *Pseudomonas* resistentes a antimicrobianos testados na Complexo Hospitalar da Universidade Federal do Ceará. *Rev. Bras. Anal. Clin.* vol. 34(1), p.27-30, 2002.
10. Assis, A.M.L., Honório, L.C., Santos, I.B., Santos Filho, L. Padrão de resistência de amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em laboratórios clínicos de João Pessoa – PB. *NewsLab*, vol. 48, p.122-133, 2001
11. Santos Filho, L., Santos, I.B., Assis, A.M.L., Xavier, D.E. Determinação da produção de metalo β lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em João Pessoa, Paraíba, *J. Bras. Patol. Med. Lab.* vol. 38(1), p.79-84, 2002.

Endereço para correspondência
Prof. Everardo Albuquerque Menezes
Rua Henrique Galeano, 1000/701
60135-420 - Fortaleza, CE

Determinação de monoclonalidade nas doenças linfoproliferativas crônicas de células B por citometria de fluxo*

Monoclonality determination by flow cytometry in B cell chronic lymphoproliferative diseases

Andréa Luciana de Araújo Cunha¹; Valéria Soraya de Farias Sales¹; Henrique Eduardo Macedo da Fonseca²; Maria Zélia Fernandes²; Aldair de Souza Paiva²; Francisco Fernandes do Nascimento Júnior²; Maria Cleide de Araújo Lopes²; Dany Geraldo Kramer Cavalcanti e Silva¹ & Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior¹

RESUMO – Introdução: Diversos estudos têm sugerido que a análise de distribuição de cadeias leves de imunoglobulinas *kappa* (κ) e *lambda* (λ), através da citometria de fluxo (FC), fornece evidências de perfil de monoclonalidade de células tumorais de origem B, em pacientes com doenças linfoproliferativas crônicas de células B (DLC-B). **Objetivos:** Investigar a eficácia da citometria de fluxo (CF) na determinação da monoclonalidade de DLC-B mediante o estudo da expressão de cadeias leves das imunoglobulinas κ e λ . **Materiais e Métodos:** Foram analisadas amostras de sangue periférico de 43 pacientes com DLC-B. As amostras foram imunofenotipadas por CF com um painel constituído de anticorpos monoclonais (AcMo): CD3, CD4, CD5, CD7, CD8, CD14, CD16, CD19, CD22, CD23, CD25, CD38, CD45, CD56, HLADR, anti-cadeia pesada das imunoglobulinas (IgH), anti-cadeia pesada μ da imunoglobulina (IgM) e anti-cadeias leves das imunoglobulinas κ e λ . Adicionalmente informações sobre idade, sexo e dados clínicos e laboratoriais presentes ao diagnóstico foram avaliados. **Resultados:** Observou-se uma relação κ/λ maior que 10:1 indicativa de proliferação maligna B em todas as amostras estudadas com expressão de cadeia leve do tipo κ em 86% e λ 14% das amostras. Análises dos resultados da imunofenotipagem associados a dados clínicos e hematológicos confirmaram 35 casos de leucemia linfocítica crônica, 3 casos de leucemia pró-linfocítica B, 3 *hairy cell leukemia*, 1 linfoma de células do manto e macroglobulinemia de Waldenström também em um caso. **Conclusões:** Os resultados obtidos mostraram que a análise da expressão das cadeias leves κ e λ pela CF é uma metodologia rápida e eficaz na detecção de proliferação maligna de linfócitos B.

PALAVRAS-CHAVE – Monoclonalidade; teste cadeias leves das imunoglobulinas *kappa* e *lambda*; doenças linfoproliferativas crônicas de células B.

SUMMARY – Introduction: Previous studies have suggested that analysis distribution of surface immunoglobulin light chain *kappa* (κ) and *lambda* (λ) by flow cytometry (FC) provides evidence for monoclonality of B cell tumors in patients with B cell chronic lymphoproliferative diseases (B-CLD). **Objective:** To investigate the FC efficiency in the monoclonality determination in B-CLD through the analysis of κ and λ light chain of immunoglobulin expression. **Materials and methods:** Samples of peripheral blood from 43 patients with B-CLD were analyzed. They were immunophenotyped by FC with the monoclonal antibody panel composed of CD3, CD4, CD5, CD8, CD10, CD19, CD22, CD23, CD25, CD38, CD45, CD16/CD56, HLADR, anti-heavy chain of immunoglobulin (IgH), anti-heavy chain μ of immunoglobulin (IgM) and anti-light chains (κ and λ) of immunoglobulin antibodies. In addition, information about sex, age and clinical and laboratorial data from the patients were also evaluated. **Results:** A relation between κ/λ higher than 10:1 was found in all samples, suggesting a malignant B cells proliferation with 86% of the samples displayed κ light chain of immunoglobulin expression and 14% displayed λ light chain of immunoglobulin expression. The immunophenotyping data associated with the hematological and clinical ones, confirmed 35 cases of B-cell chronic lymphocytic leukemia, 3 cases of B-cell prolymphocytic leukemia, 3 of hairy cell leukemia, 1 case of Waldenström macroglobulinemia and 1 of mantle cell lymphoma. **Conclusions:** The results acquired, showed that the κ and λ light chain of immunoglobulin expression analysis by FC is a simple and effective methodology in the malignant B- cell proliferation identification.

KEYWORDS – Monoclonality; *kappa* and *lambda* light chain of immunoglobulins; B cell chronic lymphoproliferative diseases.

INTRODUÇÃO

A superexpressão de uma das cadeias leves das imunoglobulinas *kappa* (κ) ou *lambda* (λ) constitui um excelente marcador imunológico das doenças linfoproliferativas crônicas de células B (DLC-B)¹⁻³. Essas doenças incluem entidades como a leucemia linfocítica crônica (LLC), leucemia prolinfocítica de células B (LPL-B), leucemia das células pilosas ou *hairy cell leukemia* (HCL), macroglobulinemia de Waldenström (MW), e linfoma de células do manto (LCM) dentre outras²⁻⁷. A imu-

nofenotipagem dessas neoplasias, deve ser realizada com um painel anticorpos monoclonais (AcMo) capaz de detectar a expressão de antígenos B: CD19, CD20, CD22, característicos de alguns subtipos de DLC-B tais como CD23, CD5, CD103, FMC7 e exclusão de antígenos T e de células *natural killer* (NK)⁷⁻¹⁰.

O teste κ/λ consiste na comparação do perfil de expressão das cadeias leves das imunoglobulinas em uma população de linfócitos B. Em uma linfocitose reacional observa-se populações de linfócitos B expressando conjuntamente uma mistura de células $\kappa+$ e $\lambda+$, ge-

Recebido em 25/6/2003
Aprovado em 18/8/2003

*Trabalho apresentado ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT/UFRN) para elaboração de monografia de conclusão do curso de Farmácia (Habilitação de Farmacêutico-Bioquímico, analista clínico)

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

ralmente na proporção de 2:1. Ao contrário, uma linfocitose de natureza neoplásica se caracteriza pela superexpressão de um tipo de cadeia leve (κ ou λ) em uma proporção igual ou superior a 10:1^{7,11}. Esse excedente clonal pode ser detectado por métodos imunológicos com o emprego de AcMo tais como a imunocitoquímica e a reação de imunofluorescência^{7,12-14}. Recentemente a citometria de fluxo (CF) graças as suas características multiparamétricas, permite analisar a diferença de expressão entre cadeias leves da imunoglobulinas κ e λ que pode ser facilmente determinada pela comparação dos padrões de histogramas, análise quantitativa e medidas de intensidade de fluorescência das populações linfocitárias marcadas com AcMo^{7,15-17}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia de estudo da expressão das cadeias leves κ e λ em linfócitos com suspeita de DLC-B.

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Casuística

Foram analisados 43 pacientes com história de linfocitose persistente, antes de qualquer intervenção terapêutica. Desses indivíduos, foram coletados 5 ml de sangue em EDTA potássico para hemograma e imunofenotipagem. Paralelamente, informações referentes aos pacientes tais como: sexo, idade e dados clínicos relacionados à doença como a presença de linfadenopatia, esplenomegalia, hepatomegalia, anemia e trombocitopenia também foram analisadas.

Metodologia

Parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos, tais como: contagem de leucócitos, dosagem de hemoglobina e contagem de plaquetas foram realizados 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 Leishmann, sendo contados 100 leucócitos em objetiva de imersão. As alterações morfológicas foram então devidamente anotadas na ficha de resultados.

O critério para a anemia foi determinado pela presença de níveis de hemoglobina inferiores a 13g/dL nos homens e 12g/dL nas mulheres, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde¹⁸, e a trombocitopenia quando a contagem de plaquetas estava abaixo de 150.000/mm³.

Imunofenotipagem e teste κ/λ

As imunofenotipagens foram realizadas com AcMo conjugados a fluorocromos como o Isotiocianato de Fluoresceína (FICT), a Phicoeritrina (PE) e o *Peridin Chlorophyll Protein* (PerCP), possibilitando a realização de 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), anti-cadeia pesada μ da imunoglobulina (IgM), e anti-cadeias leves das imunoglobulinas κ e λ , todos da *Becton & Dickinson*²⁰.

A imunomarcagem das células leucêmicas foi realizada em 100 microlitros (μ L) de sangue total previamente

homogeneizado, que foi incubado conjuntamente com 20 μ L de AcMo por 30 minutos ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Após este período, a suspensão celular foi homogeneizada sendo adicionada à mesma cerca de 2 ml de solução de lise (*Lysing Solution - Becton & Dickinson*), previamente diluída a 10% em água destilada. Procedeu-se em seguida de nova incubação por mais 10 minutos no escuro à temperatura ambiente. Em seguida, a suspensão celular foi novamente centrifugada por 5 minutos a 1.500 rotações por minutos (rpm), o sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspendido em solução salina tamponada com fosfatos (*Phosphate Buffered Saline - PBS*), pH 7.4 e novamente centrifugada a 1.500 rpm por 5 minutos, sendo este último procedimento repetido mais uma vez.

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

Para a realização do teste κ/λ procedeu-se inicialmente à incubação da suspensão celular em soro humano do grupo sanguíneo AB previamente inativado e diluído na concentração de 2% em PBS, por 20 minutos a 37°C. Após este procedimento, foi realizada uma lavagem da suspensão celular com PBS, procedendo-se em seguida à incubação com os anticorpos anti κ e anti λ ^{7,19,20}. Em todos os casos analisados, foi utilizado um controle de autofluorescência inespecífica com um conjugado IgG marcado com fluorocromos (Gama 1_{FICT} / gama 2_{PE} - *Becton Dickinson*). A leitura e as análises foram realizadas em um citômetro de fluxo (*Fluorescence Activated Cell Analyser - Facscan da Becton Dickinson, San-Jose, Ca, USA*), utilizando-se o *software cell quest*, com aquisição de 20.000 eventos, tendo como parâmetros *Forward Scatter* (FSC) em escala linear que avalia o tamanho celular, *Side Scatter* (SSC) também em escala linear, que determina a complexidade e granulosidade 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 reagiram aos AcMo. Os resultados foram fornecidos na forma de histogramas em percentagens da população celular com reação positiva ou negativa.

RESULTADOS

1- Características gerais da população analisada

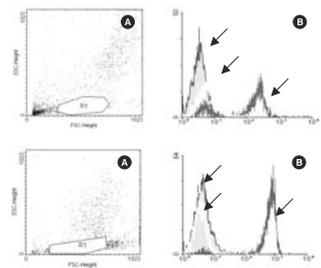
Dos pacientes estudados, 22 (51,2%) eram do sexo masculino e 21 (48,8%) do sexo feminino. A mediana de idade foi 70, variando de 48 a 92 anos.

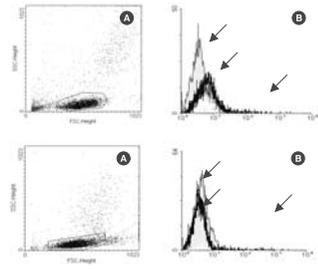
A leucometria variou de 7.800 a 334.000/mm³ e estava associada a presença de linfocitose e granulocitopenia em todos os casos analisadas.

Sinais clínicos relacionados com a doença estavam presentes na maioria dos casos, predominando a presença de linfadenopatia em 32 casos, seguida pela esplenomegalia em 31 e hepatomegalia com 25 casos respectivamente (Tabela I).

2- Imunofenotipagem e teste κ/λ

Dos 43 pacientes analisados, 35 casos receberam o diagnóstico de LLC; 3 LPL-B; 3 HCL e dois casos diagnosticados como MW e LCM cada. Todas essas doenças





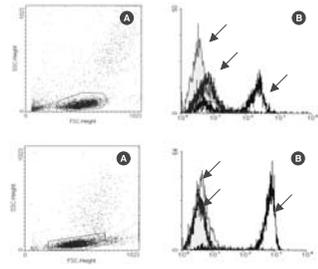


TABELA I
Características clínicas e laboratoriais da população estudada

	LLC(35)	LPL(3)	HCL(3)	LZM(1)	MW(1)
Idade/ Variação(me)	48-81(69)	66-92(77)	52-73(62)	82	72
Sexo:H/M	17/18	3/0	1/2	1/0	0/1
Linfoadenopatia	25(71,4%)	3(100%)	2(66,7%)	1(100%)	1(100%)
Esplenomegalia	24(68,6%)	3(100%)	3(100%)	0(-)	1(100%)
Anemia	19(54,3%)	3(100%)	2(66,7%)	0(-)	1(100%)
Hepatomegalia	16(47,5%)	3(100%)	1(33,3%)	0(-)	1(100%)
Leu($\times 10^3$) /Var.(me)	7.8-334.0 (90.5)	16.2-125.0 (17.9)	22.2-22.9 (22.2)	77,5	20,0
Linf(%) /Var.(me)	70-96 (81)	60-81 (61)*	60-94 (69)**	80	80
HB(g/dL) /Var.(me)	6.6-15.0 (12,7)	6.8-16.0 (8.0)	11.7-13.6 (13.0)	9.8	11,0
CP/SP($\times 10^3$) /Var.(me)	82-253.0 (170.0)	46-328.0 (106)	180-537.0 (188.0)	150,0	120,0

LLC (Leucemia Linfocítica Crônica); LPL (Leucemia Pró-Linfocítica); HCL (*Hairy Cell Leukemia*); LMC (Linfoma de Zona do Manto); MW (Macroglobulinemia de Waldenström); Mín (mínimo); Máx (Máximo); me. (mediana); SP (Sangue Periférico); HB (Dosagem de Hemoglobina); (*) contagem de pró-linfócitos maior que 55%; (**) linfócitos vilosos; H (Homem); M (Mulher); Linf.(contagem de linfócitos); Leu (contagem de leucócitos); CP (Contagem de Plaquetas), Var. (Variação: valores mínimos e máximos).

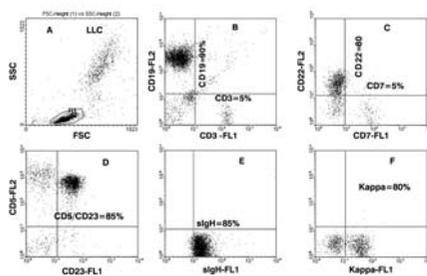


FIG. 1 - Painel de AcMo de um caso de leucemia linfocítica crônica: A) Gráfico de espalhamento luminoso levando-se em conta os parâmetros: tamanhos (FSC) x complexidade (SSC); B) Forte marcação ao CD19; C) Reação positiva para o CD22; D) Dupla marcação fortemente positiva para o CD5 e CD23; E) Baixa expressão antigênica para Imunoglobulina de superfície; F) Reação fracamente positiva para cadeia leve do tipo kappa.

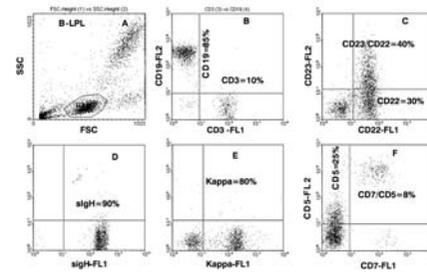


FIG. 2 - Painel de AcMo de um caso de leucemia pró-linfocítica: A) Gráfico de espalhamento luminoso levando-se em conta os parâmetros: tamanhos (FSC) x complexidade (SSC); B) Forte marcação ao CD19; C) Dupla reação positiva para o CD22 e CD23; D) Forte expressão antigênica para Imunoglobulina de superfície; E) Expressão de cadeia leve do tipo kappa; F) Fraca expressão antigênica para o CD5.

TABELA II
Características imunológicas dos casos estudados

	LLC n ^o =35	LPL n ^o = 03	HCL n ^o =03	LCM n ^o =01	MW n ^o =01
	n ^o t/n ^o +				
CD3	35/00	03/00	03/00	01/00	01/00
CD4	35/00	03/00	03/00	01/00	01/00
CD5	35/35 ▶▶	03/01 ▶	00/00	01/01 ▶▶	01/00
CD7	35/00	03/00	03/00	01/00	01/00
CD8	35/00	03/00	03/00	01/00	01/00
CD10	35/00	03/00	03/00	01/00	01/00
CD14	35/00	03/00	03/00	01/00	01/00
CD16/56	35/00	03/00	03/00	01/00	01/00
CD19	35/35	03/03	03/03	01/01	01/01
CD22	35/35	03/03	03/03	01/01	01/01
CD23	35/35	03/03	03/03	01/00	01/01
CD25	35/00	03/00	03/03	01/01	01/01
CD38	35/00	03/00	03/03	01/01	01/01
CD45	35/35	03/03	03/03	01/01	01/01
sIg	35/35 ▶	03/03 ▶▶	03/03 ▶▶	01/01 ▶▶	01/01 ▶▶
κ	35/32 ▶	03/02 ▶▶	03/02 ▶▶	01/00	01/01 ▶▶
λ	35/03 ▶	03/01 ▶▶	03/01 ▶▶	01/01 ▶▶	01/00
HLADR	35/35	03/03	03/03	01/01	01/01

LLC (Leucemia Linfocítica Crônica); LPL (Leucemia Pró-Linfocítica); HCL (*Hairy Cell Leukemia*); LCM (Linfoma de Células do Manto); MW (Macroglobulinemia de Waldenström); (▶) fraca expressão antigênica; (▶▶) forte expressão antigênica; κ (Cadeia leve kappa das imunoglobulinas); λ (Cadeia leve lambda das imunoglobulinas); SIG (imunoglobulina de superfície com expressão do cadeia pesada do tipo IgM na LLC e MW); n^o t (número total de casos estudados); n^o + (número de casos positivos).

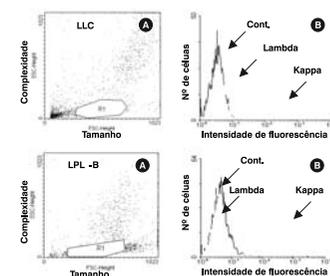


FIG. 3 - Avaliação da monoclonalidade de um caso de leucemia linfocítica crônica e de leucemia pró-linfocítica de células B: A) Gráfico de espalhamento luminoso da população celular analisada, levando-se em conta os parâmetros: tamanhos (FSC) x complexidade (SSC); B) Histogramas de intensidade de fluorescência do tubo controle e marcados com o AcMo anti kappa e lambda, caracterizando a monoclonalidade das leucemias estudadas.

apresentaram como característica comum a expressão de antígenos B relacionados (CD19 e CD22) e HLADR, em associação com a presença de imunoglobulina de superfície de natureza monoclonal (sIg/κ ou sIg/λ) e negatividade a antígenos de células T e células NK.

Os casos de LLC caracterizaram-se pela forte expressão do CD5, juntamente com sIg fracamente reagente nas células leucêmicas, distinguindo-se imunofenotipicamente de outras DLC-B por expressarem forte densidade antigênica a sIg e reação negativa ou fracamente reagente ao CD5 (Figuras 1 e 2).

Nos pacientes com HCL, observou-se negatividade do CD5 nos três casos, associada a uma reação fortemente positiva a sIg, tendo sido também detectada positividade ao CD25 e ao CD38.

No paciente com LCM, observou-se um fenótipo caracterizado pela forte expressão do CD5 e sIg associada a negatividade ao CD23, possibilitando desta forma o diagnóstico diferencial com a LLC (Tabela II).

As informações do teste κ/λ encontram-se nas Tabelas II, III e Figura 4, onde observa-se a superexpressão de κ em 37 casos (86%) e λ em 6 (14%). Nas amostras

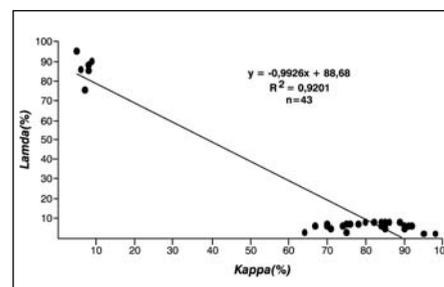


FIG. 4 - Curva de tendência ilustrativa da relação kappa/lambda nas amostras analisadas, mostrando uma correlação inversa entre as expressões dos dois tipos de cadeias leves das imunoglobulinas.

com expressão de cadeia leve do tipo κ, os valores da relação κ/λ variaram de 10,0/1 a 48,6/1 com média de 12,6/1 ao passo que nas leucemias com expressão de cadeia leve do tipo λ, observou-se variação entre 1/10,0 e 1/19,0 (média de 1/12,0), confirmado a monoclonalidade das leucemias estudadas.

Entretanto, constatou-se baixa expressão antigênica para sIg e cadeias leves κ ou λ nos pacientes com LLC contrastando com os demais tipos de leucemias que expressaram elevada intensidade de fluorescência para estes marcadores (Figuras 1, 2 e 3).

TABELA III
Resultados dos testes *kappa*/*lambda*

Caso nº	Diag	sIg/κ (%)	sIg/λ (%)	Relação κ / λ	Fenótipo
01	LLC	74	6	12,3/1	κ+/λ-
02	LLC	89	8	11,1/1	κ+/λ-
03	LLC	67	6	11,2/1	κ+/λ-
04	LLC	84	6	14,0/1	κ+/λ-
05	LLC	84	8	10,5/1	κ+/λ-
06	LLC	76	7	10,8/1	κ+/λ-
07	HCL	75	3	25,0/1	κ+/λ-
08	LLC	95	2	47,5/1	κ+/λ-
09	LLC	71	5	14,2/1	κ+/λ-
10	LLC	70	6	11,7/1	κ+/λ-
11	LLC	85	5	17,0/1	κ+/λ-
12	LLC	84	6	14,0/1	κ+/λ-
13	LLC	78	7	11,1/1	κ+/λ-
14	LLC	89	8	11,1/1	κ+/λ-
15	LLC	85	7	12,1/1	κ+/λ-
16	LLC	64	3	21,3/1	κ+/λ-
17	LLC	70	7	10,0/1	κ+/λ-
18	LLC	90	5	18,0/1	κ+/λ-
19	LLC	80	8	10,0/1	κ+/λ-
20	LLC	85	8	10,6/1	κ+/λ-
21	LLC	82	8	10,2/1	κ+/λ-
22	LLC	98	2	49,0/1	κ+/λ-
23	LLC	80	8	10,0/1	κ+/λ-
24	LLC	75	7	10,7/1	κ+/λ-
25	LLC	84	8	10,5/1	κ+/λ-
26	HCL	82	8	10,2/1	κ+/λ-
27	LLC	91	6	15,2/1	κ+/λ-
28	LPL	84	8	10,5/1	κ+/λ-
29	MW	76	7	10,8/1	κ+/λ-
30	LLC	86	8	10,8/1	κ+/λ-
31	LPL	90	6	15,0/1	κ+/λ-
32	LLC	75	7	10,7/1	κ+/λ-
33	LLC	85	8	10,6/1	κ+/λ-
34	LLC	90	6	15,0/1	κ+/λ-
35	LLC	92	6	15,3/1	κ+/λ-
36	LLC	85	8	10,6/1	κ+/λ-
37	LLC	85	7	12,1/1	κ+/λ-
38	LLC	6	86	1/14,3	κ-/λ+
39	LLC	5	95	1/19,0	κ-/λ+
40	LLC	9	90	1/10,0	κ-/λ+
41	LPL	8	88	1/11,0	κ-/λ+
42	HCL	8	85	1/10,6	κ-/λ+
43	LCM	7	75	1/10,7	κ-/λ+

(LLC) Leucemia Linfóide Crônica, (HCL) *Hairy Cell Leukemia*, (LPL) Leucemia Pró-Linfocítica; (LCM) Linfoma de Células do Manto, MW) Macroglobulinemia de Waldenström, (κ / λ) kappa/lambda – cadeias leves das imunoglobulinas.

DISCUSSÃO

Uma das aplicações mais significativas do emprego das técnicas de imunofenotipagem pela CF no diagnóstico laboratorial das DLC-B consiste na detecção do excedente clonal de células B em indivíduos com suspeita de doenças linfoproliferativas crônicas, através da superexpressão de um tipo de cadeia leve das imunoglobulinas^{7,13-17,21-24}. Esse excedente clonal é evidenciado pela expressão de um tipo de cadeia leve das imunoglobulinas (*kappa* ou *lambda*) na superfície ou intracitoplasmática, sendo considerada como igual ou maior que 10:1 a relação entre a expressão dos dois tipos de cadeias leves como significativa de monoclonalidade e, portanto indicativo de proliferação maligna de células B^{7,13-17,21-24}.

No presente artigo, o referido teste foi realizado no sangue total previamente homogeneizado, que foi incubado diretamente com anticorpos conjugados a FICT e direcionados contra as cadeias leves das imunoglobulinas κ e λ, ficando a monoclonalidade estabelecida pela superexpressão de κ em 86% e λ em 14% das amostras. Este método mostrou ser de fácil aplicação, rápido e eficaz para avaliação preliminar da natureza reacional ou neoplásica em portadores de linfocitose persistente. Entretanto, nesse ensaio, foi necessária uma incubação preliminar com solução de soro AB a 37°C, visando impedir a ligação do AcMo com as imunoglobulinas presentes no soro, bem como, ao bloqueio de receptores inespecíficos para fração FC das imunoglobulinas presentes nos linfócitos B, monócitos, neutrófilos e células NK^{7,19,20}. Adicionalmente, um painel constituído de AcMo específicos para DLC-B associado com dados clínicos e achados hematológicos confirmaram o diagnóstico dessas doenças, possibilitando, também, a classificação dos diversos subtipos dessas neoplasias, sendo diagnosticados 35 casos de LLC, 3 casos de LPL-B e de HCL, 1 de LCM e de MW.

A LLC é uma doença que cursa com leucometria elevada às custas de linfócitos morfológicamente maduros. Do ponto de vista imunológico, caracteriza-se pela fraca expressão de sIg de natureza monoclonal associada com AcMo que identificam linfócitos B: CD19, CD20, CD22 e CD23. No entanto, a característica imunológica mais importante da LLC é a forte expressão do CD5 que conjuntamente com a baixa de reatividade para a sIg e negatividade ao FMC-7 possibilitam o diagnóstico diferencial entre a LLC e outras DLC-B como a HCL e LPL-B. Estas doenças são CD5 negativas além de expressarem fortemente a sIg²⁸⁻³³.

Neste estudo a presença de linfocitose persistente com a expressão do CD19, CD22, CD23 e HLADR, associada a forte marcação do CD5 e fraca reatividade para a sIg, possibilitou a distinção entre a LLC e outras DLC-B, tendo sido observada a expressão de sIg/κ em 32 (92,4%) casos e de sIg/λ em 3 (18,6%).

A LPL cursa com esplenomegalia volumosa, linfadenopatia e leucometria elevada às custas de pro-linfócitos. Estas leucemias podem ser de origem B ou T. A LPL-B é caracterizada pela forte expressão das sIgs e reação negativa ou fracamente positiva ao CD5 e reatividade com AcMo que identificam células B como o CD19, CD20, CD21, CD22 e CD23^{6,9}. Nesse estudo, em contraste os casos de LLC, as amostras dos três pacientes com LPL-B caracterizaram-se pela fraca reatividade

ao CD5 em um caso e forte reatividade a sIg, sendo observada expressão de cadeia leve do tipo κ em 2 e 1 em um paciente. Os achados imunofenotípicos dos três pacientes com a HCL estão em concordância com os dados da literatura que mostraram expressão de CD19+, CD20+, CD22+, CD25+, CD38+ e CD5-, associados à ausência de antígenos T e de células NK e forte expressão de sIg de natureza monoclonal^{16,9,35,36}, sendo neste trabalho observada o fenótipo sIg/ κ em 2 casos.

A MW consiste em uma proliferação monoclonal de células linfóides B secretoras de imunoglobulina do tipo M (IgM), apresentando como características imunofenotípicas a positividade aos antígenos CD19, CD22 e CD38 e também elevados níveis de IgM intracitoplasmática (cIgM), de superfície (sIgM) e no soro^{6,9,37}. Nesse estudo foram observadas características imunofenotípicas de acordo com o descrito pela literatura e a monoclonalidade constatada pela superexpressão de cadeia leve do tipo λ .

Estudos imunológicos e histopatológicos demonstram que o LCM origina-se de linfócitos oriundos de região da zona do manto dos linfonodos. Em sua fase leucêmica, é uma doença de difícil diagnóstico diferencial com a LLC, em virtude da expressão do CD5 também ocorrer no LCM. Entretanto, a forte expressão sIgM, associada à ausência do CD23, permite o diagnóstico diferencial com a LLC^{6,9,38}, que foi observado neste estudo.

De acordo com os resultados apresentados, conclui-se que a análise da expressão das cadeias leves das imunoglobulinas *kappa* e *lambda* mostrou-se útil na confirmação da natureza neoplásica de proliferação linfocitária B em amostras de sangue periférico de indivíduos com linfocitose. A monoclonalidade foi estabelecida pela demonstração da expansão de um clone de células B expressando um tipo de cadeia leve em detrimento de outra em uma relação maior que 10:1. Adicionalmente, um painel de AcMo confirmou a presença de DLC-B, possibilitando também a classificação imunológica de acordo com o padrão de expressão desses marcadores.

REFERÊNCIAS

- 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.
- Gerard R. and Robillard N.- Immunophenotypic characterization of acute leukemias and chronic lymphoproliferative disorders: practical recommendations and classifications. *Hematol. Cell. Ther.* 38: 471-486, 1996.
- Harris N.L.; Jaffe E.S.; Stein H.; Banks P.M.; Chan J.K.C.; Cleary, M.L.; Delsol, G.; Wolf-Peeters C.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.
- Tbakin A.; Edinger M. and Myles J. - Flow cytometric immunophenotyping of non-Hodgkin's lymphomas and related disorders. *Cytometry.* 25: 113-124, 1996.
- Sans-Sabrafen J. in: *Hematologia Clínica*, ed. Mosly / Doyma livros, Cap. 1, pgs 1 - 28, 1994.
- Ruiz-Argüelles G.J. and San-Miguel J.F.- *Actualización en leucemias*, Editora Panamericana, Mexico, 1996.
- Stetle-Steverson M. and Braylan R.C.- Flow cytometric analysis of lymphomas and lymphoproliferative disorders *Semin. Hematol.* 38 (2): 111-123, 2001.
- Cheson B.D.; Bennet J.M.; Grever M.; Kay N.; Keating M.J.; O'Brien S.; Rai K.R. - National Cancer Institute - Sponsored working group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised Guidelines for diagnosis and treatment. *Blood.* 87(12): 4990-4997, 1996.
- Cheson B.D. in: *Chronic lymphoid leukemias*, 2nd edition, revised and expanded, Marcel Dekker, INC, New York, 2001.
- Freedman A.S. and Nadler L.M.- Cell surface markers in hematologic malignancies. *Seminars in Oncology.* 14(2): 193-212, 1987.

- Solomon A. - Light chain of immunoglobulin: structural - genetic correlates. *Blood.* 68 (3): 603-610, 1986.
- Tubbs R.R. et al. - Tissue immunomicroscopic avaliation of monoclonality of B-cell lymphomas: comparison with cell suspension studies. *J. Clin. Pathol.* 76 (1): 24-28, 1981.
- Abe M.; Goto T.; Kennel S.J.; Wolfenbarger D.; Macy S.D.; Weiss D.T. and Solomon A. - Production and immunodiagnostic applications of antihuman light chain monoclonal antibodies. *Hematopathology.* 100 (1): 67 - 74, 1993.
- Têtu B.; Manning J.T.; Ordonez N. - Comparison of monoclonal and polyclonal antibodies directed against immunoglobulin light and heavy chains in Non-Hodgkin's Lymphoma. *J. Clin. Pathol.* 85 (1): 25-31, 1986.
- Berliner N.; Ault K.A.; Martin P. and Weinberg D.S.- Detection of clonal excess in lymphoproliferative disease by κ/λ analysis: Correlation with immunoglobulin gene DNA rearrangement. *Blood.* 67(1): 80-85, 1986.
- Johnson A.; Cavallin-Stahl E. and Akerman M.- Flow cytometry light chain analysis of peripheral blood lymphocytes in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Br. J. Cancer.* 52: 159-165, 1985.
- Peters R.E.; Janossy G.; Ivony K., Al-ismail S. and Mercolino T.- Leukemia-Associated changes identified by quantitative flow cytometry. III. B-cell gating in CD37/ κ/λ clonality test. *Leukemia.* 8 (11): 1864-1870, 1994.
- WHO (World Health Organization) Technical Report Series, Nº 405, 1968.
- Hsi E.D.; Holtge Gand Tubbs R. - Biclinal chronic lymphocytic leukemia *Am. J. Clin. Pathol.* 113: 798-804, 2000.
- Becton Dickinson Immunocytometry Systems, 1995.
- 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.
- Soper L.; Berhardt B.; Eisenberg B.; Cacciapaglia B.; Bennet L.; Sanda A.; Baird M.; Silver R. and Benn P.- Clonal immunoglobulin gene rearrangements in chronic lymphocytic leukemia: A correlative study. *American Journal of Hematology.* 27: 257-264, 1988.
- Sollanki D.L.; McCurdy P.R. and MacDermott R.P. - Chronic lymphocytic leukemia: A monoclonal disease. *American Journal of Hematology.* 13: 159-162, 1982.
- Smith B.R.; Weiberg D.S.; Robert N.J.; Towlw M.; Luher E.; Pinkus G.S. and Ault K.A. - Circulating monoclonal B lymphocytes in non-Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 311: 1476-1481, 1984.
- Rechavi G.; Mandel M.; Katzir N.; Brok-Simoni F.; Hakim I.; Holtzman F.; Biniaminov M.; Givol D.; Bem-Bassat I. and Ramot B. - Immunoglobulin heavy chain rearrangements in chronic lymphocytic leukemia: correlation with clinical stage. *British Journal of Haematology.* 71: 524-529, 1989.
- Solomon A. - Clinical implications of monoclonal light chains. *Seminars in Oncology.* 13 (3): 341-349, 1986.
- 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.
- Peter G.R. and Foon K.A. - Biology of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Hematology.* 24 (4): 209-229, 1987.
- 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.
- Freedman A.S. - Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 4 (2): 405-429, 1980.
- Rozman C. and Montserrat E.- Chronic lymphocytic leukemia. *The New England Journal of Medicine.* 333 (16): 1052-1056, 1995.
- Ginaldi L.; De Martinis M.; D'Ostilio A.; Loreto F. and Quaglino D. - The immunophenotypic analysis of chronic lymphoid leukemias. *The Cancer Journal.* 11 (6): 284- 288, 1998.
- Massimo L.G.; De Martinis M.; Matutes E.; Farahat N.; Morila R. and Catovsky D. - Levels of expression of CD19 and CD20 in chronic B cell leukemias. *J. Clin. Pathol.* 51: 364-369, 1998.
- Lavabre-Brertrand T.; Janossy G.; Exbrayat C.; Bourquard P.; Duperray 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.
- Robbins B.A.; Elinson D.J.; Spinosa J.C.; Carey C.A.; Lukes C.R.; Poppe S.; Saven A. and Piro L.D. - Diagnostic application of two-color flow cytometry in 161 cases of hairy cell leukemia. *Blood.* 82 (4): 1277-1287, 1993.
- Matutes E. - Contribution of immunophenotype in the diagnosis in classification of haemopoietic malignancies. *J. Clin. Pathol.* 48: 194-197, 1995.
- Dinopoulos, M.A. and Alexanian, R. - Waldenström's macroglobulinemia. *Blood.* 83: 1452-1459, 1994.
- 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 clinic pathological study of 55 cases. *Histopathology.* 26(17-24), 1995.

Endereço para correspondência
 Prof. Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior
 Disciplina de Imunologia Clínica
 Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / DACT
 Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte / UFRN
 Rua General Gustavo Cordeiro de Farias S/N, Petrópolis, Natal-RN
 E-mail: gbcjunior@hotmail.com

Importância da detecção de anticorpos antinucleares pela técnica de imunofluorescência indireta HEp-2 em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico*

The importance of antinuclear-antibodies detection in patients with Systemic Lupus Erythematosus by indirect immunofluorescence HEp-2 technic

Ana Cristina Maciel Vilar de Queiroz¹; Andréa Luíza Freire¹; Roberto Vasconcelos Chaves²; Dyná Marcelino Atanásio³; Sarah Dantas Viana Medeiros³; Antônio Sérgio da Fonseca⁴; Valéria Soraya de Farias Sales⁵ & Janaina Cristiana de Oliveira Crispim⁵

RESUMO – Anticorpos antinucleares (ANA) constituem um grupo de auto-anticorpos dirigidos contra ácidos nucléicos e nucleoproteínas, encontrados nas colagenoses. A detecção desses auto-anticorpos é feita através de uma metodologia sorológica simples e sensível denominada técnica de imunofluorescência indireta (IFI) com células epiteliais humanas (HEp-2). Esses auto-anticorpos podem ser específicos de determinados órgãos ou sistêmicos, como ocorre em várias doenças das quais o Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é o protótipo. O objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa de ANA em pacientes provenientes do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL) UFRN com indicação clínica de LES e outras doenças auto-imunes, como também a realização de testes sorológicos complementares (VDRL, PCR e FR). Dos 75 pacientes estudados, 22 (29,3%) obtiveram ANA positivo sendo que 11 (50%) receberam diagnóstico final de LES. Em relação aos exames complementares foi observado que 18,2% dos pacientes apresentaram VDRL reativo, 81,8% PCR positiva e 18,2% FR positivo. A detecção do ANA pela IFI-HEp-2 consistiu de um método sensível para paciente com suspeita de LES e outras doenças auto-imunes.

PALAVRAS-CHAVE – Anticorpos Antinucleares (ANA); Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES); Imunofluorescência Indireta (IFI); Doenças Auto-Imunes.

SUMMARY – Anti-nuclear antibodies (ANA) are constituted for auto-antibodies group leaded against nucleic acid and proteins of the nucleous, who are found in collagenes tissue. The auto-antibodies detection is realized by simple and sensible sorologic methodology, called Immunofluorescence Indirect (IFI) using HEp-2 cells like substratum. The auto-antibodies can be a specific organ or systemic, like in several diseases when the Systemic Lupus Erythematosus (SLE) is prototype. This technic was made in patients at the Onofre Lopes University Hospital (HUOL) with clinic indication to SLE or others auto-immune diseases as well sorological tests like VDRL, PCR and FR. From 75 patients studied, 22 (29.33%) were detect positive ANA while 11 (50%) of them showed clinic indication to SLE. Other exams shows positive PCR (81.8%); reactive VDRL (18.2%) and positive FR (18.2%). Therefore the clinic indication has its importance, the laboratory be a decisive part doing a precocious detection of ANA by the IFI-HEp-2 technic through the screening method in patients with SLE or others auto-immune diseases.

KEYWORDS – Antinuclear Antibodies (ANA); Systemic Lupus Erythematosus (SLE); Indirect Immunofluorescence (IFI-HEp-2); Autoimmune Diseases.

INTRODUÇÃO

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é uma doença inflamatória crônica do tecido conjuntivo, de caráter auto-imune, cujo mecanismo imunopatológico envolve amplo espectro de manifestações clínicas e alterações sorológicas, que resultam da ação direta de auto-anticorpos e da deposição de imunocomplexos (Grandelle *et al.*, 2002; Messias-Reason *et al.*, 2002; Costallat; Appenzeller; Marini, 2002; Melo *et al.* 2002). Tais manifestações evoluem com períodos de remissão e exacerbação, sendo o comprometimento renal o principal determinante da morbidade e mortalidade da doença (Grandelle *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2002).

Apesar do LES ser considerado o protótipo das doenças auto-imunes sistêmicas sua etiologia permanece

desconhecida, embora existam fatores que possam desencadear a quebra da tolerância imunológica, tais como: fatores genéticos, ambientais, hormonais, drogas, infecções, dentre outros (Sato *et al.*, 2002).

De particular importância para o diagnóstico do LES é a pesquisa dos anticorpos antinucleares (ANA) pela técnica de Imunofluorescência Indireta (IFI), utilizando como substrato células epiteliais humanas (células HEp-2). Essa técnica possui alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico do LES, sendo assim, a negatividade do ANA praticamente exclui a doença, a não ser com alta suspeita clínica. O resultado conclusivo é liberado em termos da última titulação positiva e padrão de fluorescência observado. (Sato *et al.*, 2002).

O objetivo desse trabalho foi pesquisar o ANA em pacientes do HUOL com suspeita clínica de LES e ou-

Recebido em 14/8/2003

Aprovado em 18/8/2003

* Trabalho apresentado ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (DACT/UFRN) para elaboração de monografia de conclusão do curso de Farmácia na habilitação de Farmacêutico-Bioquímico

¹ Acadêmicas concluintes do curso de graduação em Farmácia, habilitação em Análises Clínicas; ² Bolsistas de Iniciação Científica CNPQ-PIBIC;

³ Farmacêutico-Bioquímico; ⁴ Professor da disciplina de Reumatologia Pediátrica; ⁵ Professoras da disciplina de Imunologia Clínica do DACT/ UFRN







tras doenças auto-imunes, como também a realização de testes sorológicos complementares (VDRL, PCR e FR).

CASUÍSTICA E METODOLOGIA

Casuística

Foram estudados 75 pacientes procedentes do Hospital Universitário Onofre Lopes (HUOL-UFRN), com a finalidade de realizar a pesquisa do anticorpo antinuclear (ANA), no período de setembro de 2000 a fevereiro de 2001.

A anamnese dos pacientes foi realizada a partir do preenchimento de uma ficha com informações clínico-laboratoriais.

As amostras sanguíneas coletadas foram centrifugadas, e o soro então obtido dividido em três alíquotas, que posteriormente foram acondicionadas em tubos de endorferos e encaminhadas ao Laboratório de Imunologia Clínica da Faculdade de Farmácia-UFRN. As alíquotas foram imediatamente armazenadas em freezer, à temperatura de -20°C , até o momento da realização da pesquisa do ANA por IFI-HEp-2 e dos exames complementares como: VDRL, Proteína C Reativa (PCR) e Fator Reumatóide (FR).

Metodologia

Técnica de imunofluorescência indireta

Inicialmente os soros dos pacientes foram submetidos à diluição de 1:40 em solução fosfato tamponada (PBS) e em seguida $20\mu\text{L}$ de cada diluição colocados em cavidades distintas da lâmina. Adicionou-se também $20\mu\text{L}$ dos controles positivo e negativo em seus respectivos espaços. Posteriormente a lâmina foi incubada em câmara úmida à temperatura ambiente por 30 min. Após esse intervalo de tempo realizou-se a lavagem com PBS a fim de remover os interferentes. Adicionou-se por 30 min o conjugado (anti-anticorpo marcado com isotiocianato de fluoresceína). Para a retirada do excesso de conjugado promoveu-se lavagem, secagem e montagem da lâmina com glicerina tamponada com subsequente leitura ao microscópio de imunofluorescência (Nikon-Japan Labophot-2) em aumento de 40x. Os laudos do ANA foram liberados em termos da última titulação positiva e padrão de fluorescência encontrada.

Técnica de aglutinação indireta

Para pesquisar a proteína C reativa e o fator reumatóide, foram utilizadas partículas de látex sensibilizadas com anticorpos antiproteína C reativa e antifator reumatóide, respectivamente.

Técnica de floculação

Na realização do VDRL foi utilizada uma suspensão de cardioplipina, colesterol e lecitina, com a finalidade de detectar a presença de anticorpo anticardioplipina no soro dos pacientes com suspeita de doenças auto-imunes.

Análise estatística

As variáveis relacionadas para análise foram estudadas utilizando-se:

- o teste não-paramétrico de χ^2 (qui-quadrado);
- o nível de significância para os testes estatísticos foi estabelecido em 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 75 pacientes estudados, 22 (29,3%) obtiveram ANA Positivo, enquanto 53 (70,7%), ANA Negativo (Fig.1).



FIG. 1 - Percentual de detecção dos anticorpos antinucleares por IFI-HEp-2

Dentre os pacientes ANA Positivos 11 (50%) receberam diagnóstico final de LES, enquanto os demais estavam acometidos por outras doenças auto-imunes (Tab.I e Fig.2).

TABELA I

Tipos de doenças auto-imunes e número de pacientes acometidos

Doenças diagnosticadas	Número de paciente ANA +
Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES)	11
Artrite Reumatóide (AR)	3
Síndrome Nefrótica (SN)	2
Esclerose Sistêmica (ES)	2
Granulomatose de Wegner (GW)	1
Doença Mista do Tecido Conjuntivo (DMTC)	1
Glomerulonefrite Difusa (GD)	1
Dermatomiosite Juvenil (DJ)	1

Fonte: HUOL - Hospital Universitário Onofre Lopes

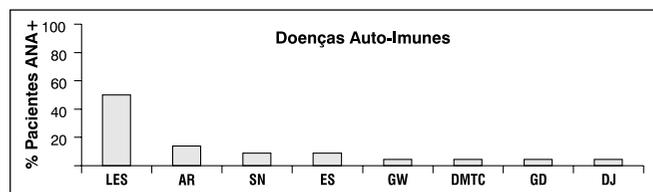


FIG. 2 - Percentual das doenças auto-imunes diagnosticadas nos pacientes ANA positivos. (As barras representam as médias dos percentuais das doenças auto-imune nos pacientes ANA positivos. * $p < 0,05$ comparando o percentual de pacientes ANA positivo com o LES).

De acordo com os achados clínicos, 30% dos pacientes apresentaram rash malar (Fig.3) e acometimentos articulares, os quais são considerados os sintomas mais frequentes do LES. Um paciente apresentou pesquisa de ANA negativa e foi classificado como portador de LES de acordo com os achados clínicos evidenciados, totalizando assim 12 pacientes lúpicos. Nakamura & Mühlen (2002) afirmaram em seus trabalhos que a pesquisa de ANA pode ser negativa caso o paciente esteja fazendo uso de corticosteróides ou imunossupressores ou ainda devido a presença de outros auto-anticorpos que podem ser detectados devido a alta sensibilidade do método.



FIG. 3 - Presença de rash malar em paciente com LES.

Dentre os portadores de LES, 10 (83,3%) eram do sexo feminino com idade média de 22 anos, e 2 (16,7%) do masculino (* $p < 0,05$). Este achado está de acordo com o observado por Messias-Reason e colaboradores (2002) que destacaram maior frequência de ANA positivo em mulheres na idade fértil, ressaltando assim a importância dos hormônios femininos no curso da doença.

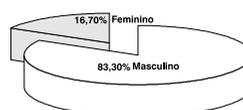
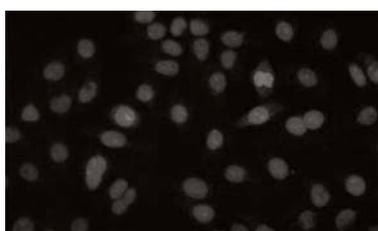
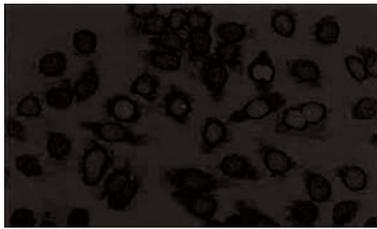


FIG. 4 - Percentual de pacientes lúpicos de acordo com o sexo.







Os títulos dos auto-anticorpos encontrados estavam compreendidos na faixa de 1/40 a 1/640, de forma que a diluição de 1/40 apresentou-se em 45,4% dos casos, a de 1/80 em 18,2%, 1/320 em 27,3% e 1/640 em 9,1% (Fig. 5). O maior predomínio da diluição 1/40 foi devido a esses pacientes terem feito uso de medicamentos imunossupressores e corticosteróides no período que antecedeu a coleta sanguínea.

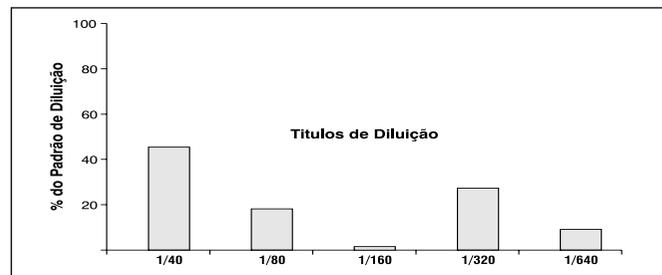


FIG. 5 – Percentual de títulos obtidos pela técnica de IFI-Hep-2 nos pacientes ANA positivo. (As barras representam as médias dos percentuais dos títulos obtidos pela técnica IFI-HEP-2 nos pacientes ANA positivos. * $p < 0.05$ comparando o percentual de pacientes ANA positivo com o título da diluição de 1/40).

Entre os padrões de fluorescência encontrados observou-se que: 4 (36,4%) dos pacientes apresentaram padrão periférico, 4 (36,4%) padrão homogêneo e 3 (27,2%) padrão pontilhado (Fig.7). Somensi (1999) & Pfrimer e colaboradores (2002) demonstraram em seus trabalhos que esses são os principais padrões encontrados no diagnóstico do LES. Nakamura & Mühlen (2002) ressaltam que o tipo de padrão é de grande importância pois sugere o acometimento de determinados órgãos, como por exemplo o padrão homogêneo (Fig.6) que assinala predisposição à nefrite lúpica.

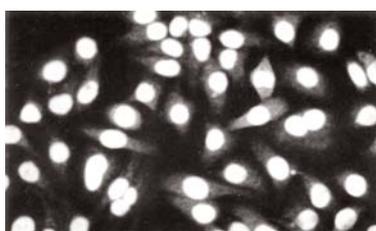


FIG. 6 – Padrão de Fluorescência Homogêneo.

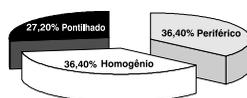


FIG. 7 - Percentual dos padrões de fluorescência encontrado.

O VDRL reativo pode ser encontrado em 10 a 30% dos pacientes com LES, provavelmente devido à exposição do tecido conjuntivo rico em fosfolípidios (Sato *et al.*, 2002). No estudo realizado o teste do VDRL foi reativo em 18,2% dos pacientes lúpicos sendo 81,8% não reativo (* $p < 0.05$), sugerindo que os pacientes reativos estão mais susceptíveis a manifestações clínicas

vaso-oclusivas, que incluem trombose venosa, oclusão arterial, úlcera de perna e perda fetal recorrente no segundo e terceiro trimestres de gestação.

A proteína C reativa (PCR) pode estar presente nas agudizações, sendo um marcador de processo inflamatório inespecífico, seus níveis podem estar baixos mesmo em casos de doença ativa. A positividade do teste foi de 81,8%, sugerindo que a população em análise encontrava-se na fase aguda da doença.

O fator reumatóide (FR) é um auto-anticorpo contra a fração Fc da imunoglobulina IgG, IgM e/ou IgA; podendo estar presente em 20 a 60% dos portadores de LES ou outras doenças auto-imunes. Em nossa casuística 18,2% foi confirmada a presença deste fator.

CONCLUSÃO

A pesquisa do ANA mostrou-se útil como critério diagnóstico nos pacientes com suspeita de LES, pois em pacientes não tratados esta reação é positiva em 98% dos casos. Podendo também apresentar-se positiva, embora com menor intensidade, em outras doenças auto-imunes. Os testes complementares foram importante para o prognóstico e monitorização da terapêutica nestes pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Costallat, L.T.L.; Appenzeller, S.; Marini, R. Evolução e fatores prognósticos do Lúpus Eritematoso Sistêmico em relação com a idade de início. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 42, n. 2, p.92, Mar/Abril, 2002.
2. Grandelle, M. *et al.* Estudo da hipertensão arterial pulmonar no Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 42, n. 5, p.290, Set/Out, 2002.
3. Melo, M. *et al.* Patologia Clínica nas Doenças Auto-Imunes Sistêmicas. *LAES & HAES*, v. 6, n. 134 p.170-173, Dez 2001/ Jan 2002.
4. Messias-Reason, I.T. *et al.* Produtos de ativação do complemento como marcadores sensíveis de atividade do Lúpus Eritematoso Sistêmico. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 42, n.3, p. 155, Mai/Jun, 2002.
5. Nakamura, R.M.; Mühlen, C. A. von. Progressos nos testes laboratoriais para doenças auto-imunes em seres humanos. *LAES & HAES*, v.2, n. 130, p.168, Abril/ Maio 2002.
6. Pfrimer, I. A. H. *et al.* Laudos de FAN em Células HEp-2: Padronização da Nomenclatura de Acordo com o 1º Congresso Nacional Brasileiro. *LAES & HAES*, v. 6, n. 134, p. 60, Dez 2001/ Jan 2002.
7. Sato, E.I. *et al.* Consenso brasileiro para o tratamento do Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES). *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 42, n.6, p.363-364, Nov/Dez, 2002.
8. Somensi, C. C. Padrões Verificados em Teste de Imunofluorescência em Lâminas de Células HEp-2 Hermagen Virgo. *LAES & HAES*, v. 4, n.120, p. 188; 194, Ago/Set, 1999.

Endereço para correspondência

Profª Janaina Cristiana de Oliveira Crispim
Rua Monsenhor João da Matta, 20 - Lagoa Nova
Natal, RN - 59075-020
E-mail: janacrispim@hotmail.com

Assessoria para cursos de extensão

A assessoria tem a finalidade de organizar, ministrar e incentivar a realização de cursos de educação continuada, reciclagem profissional, atualização, aperfeiçoamento e especialização (Pós-graduação *Lato sensu*, de acordo com as solicitações do CES-CNE/MEC). Para tanto, será oferecido um conteúdo

programático (programa em elaboração) constituído por módulos onde constarão os assuntos, a relação dos professores ministrantes e a carga horária. As regionais e delegacias poderão optar pelos módulos de maior interesse para a região, como poderão optar por módulos que possam ser ministrados por professores no local a ser oferecido

para o curso. Neste caso, o conteúdo do módulo e a titulação do professor ministrante deverão ser aprovados pela comissão assessora.

O conteúdo programático procurará contemplar o Programa aplicado à prova de obtenção do Título de Especialista em Análises Clínicas.

Comissão Assessora

Amauri Simonetti/UFRGS
(0xx31)3233-6788
E-mail: simonetti@cpo-vo.net

Paulo J. Saraiva/UFRGS
(0xx51)3330-8289/3316-5244,

Coordenador:
Antenor H. P. Pedraza/USP-RP
(0xx16)625-4970
E-mail: pedraza@cirp.usp.br

Arício Treitinger/UFSC
(0xx48)233-2720

Homero J. J. Lopes/UFMG
(0xx31)3275-3756
E-mail: sac@goldanalisa.com.br.

Atividade antifúngica de maleimidias contra dermatófitos isolados de *Tinea capitis*

Maleimides' antifungal activity against dermatophytes from *Tinea capitis*

Aquino, P.M.L.P.¹; Lima, E.O.²; Farias, M.P.²; Freire, K.R.L.²;
Souza, E.L.²; Cechinel Filho, V.³; Correa, R.³; Nunes, R.J.⁴ & Andricopulo, A.⁴

RESUMO – *Tinea capitis* é uma micose produzida pelos dermatófitos dos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* que parasitam os pêlos e pele do couro cabeludo. Tendo em vista a necessidade de obter princípios ativos para uma possível aplicação prática no tratamento de infecções, o estudo de produtos de origem vegetal ou sintética, com atividade antifúngica vem recebendo grande ênfase. Neste trabalho, foi feita avaliação da atividade antifúngica de cinco maleimidias: 3,4-dicloro-*N*-fenil-etil-maleimida, 3,4-dicloro-*N*-benzil-maleimida, 3,4-dicloro-*N*-fenil-butil-maleimida, 3,4-dicloro-*N*-fenil-propil-maleimida e 3,4-dicloro-*N*-fenil-maleimida. Tais substâncias foram testadas *in vitro*, através do método de difusão em meio sólido, contra 20 cepas de dermatófitos, isolados de amostras clínicas de pacientes portadores de *tinea capitis*. Os resultados destacaram a atividade antifúngica apresentada pelo composto 3,4-dicloro-*N*-fenil-etil-maleimida, inibindo 100% das cepas testadas na concentração de 200µg/ml, e 3,4-dicloro-*N*-fenil-propil-maleimida, que apresentou uma CIM de 6,3µg/ml.

PALAVRAS-CHAVE – Maleimidias, *Tinea capitis*, dermatófitos, atividade antifúngica.

SUMMARY – *Tinea Capitis* is a mycosis produced for dermatophytes of the *Trichophyton* and *Microsporum* genus that parasite the hair and hairy leather. Due the need of to obtain actives principles of practical application in infections treatment, the research of natural products owner of antifungal properties receive big emphasis. In this work was evaluated the antifungal activity of five maleimides. Its were 3,4-dichlorine-*N*-phenyl-ethyl-maleimide, 3,4-dichlorine-*N*-benzyl-maleimide, 3,4-dichlorine-*N*-phenyl-butyl-maleimide, 3,4-dichlorine-*N*-phenyl-propil-maleimide e 3,4-dichlorine-*N*-phenyl-maleimide. It was tested *in vitro*, by medium solid diffusion method, against 20 dermatophytes strains isolated of clinical samples from patients bearer of *Tinea captis*. The results show the antifungal activity presented in the 3,4-dichlorine-*N*-phenyl-ethyl-maleimide compound, which inhibited 100% of strains tested at 200µg/ml concentration and 3,4-dichlorine-*N*-phenyl-propil-maleimide compound wich presented a CIM of 6,3µg/ml.

KEYWORDS – Maleimides, *Tinea capitis*, dermatophytes, antifungal activity.

INTRODUÇÃO

As dermatofitoses são micoses superficiais frequentes no homem, causadas por dermatófitos dos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Os fungos parasitam as porções queratinizadas ou semiqueratinizadas da pele, pêlos e unhas. Podem ser exclusivos da espécie humana (antropofílicos), próprios de animais (zoofílicos) ou viver no solo (geofílicos) (Abrahan *et al.*, 1986; Lacaz *et al.*, 1991).

Interessar-nos-á o estudo destes parasitas nos pêlos do couro cabeludo, causando a entidade nosológica conhecida como *Tinea capitis* ou, simplesmente, tinha do couro cabeludo.

De modo geral, o diagnóstico clínico e micológico da *Tinea capitis* não é difícil, baseando-se nos dados clínicos e encontro de estruturas hifálicas no material biológico do exame direto. Este, ainda pode ser confirmado e ampliado pelo isolamento e identificação do agente etiológico, utilizando-se procedimentos adequados (Lacaz *et al.*, 1991; Crissey *et al.*, 1995).

O tratamento usual da *Tinea capitis* é feito por via oral, com tempo de duração de acordo com a evolução da lesão ou lesões. Griseofulvina (10mg/kg/dia) e cetoco-

nazol (5mg/kg/dia) têm ação fungistática, são igualmente eficazes e seus efeitos secundários são equivalentes (Saurat *et al.*, 1990). Podem ser usados os derivados imidazólicos como itraconazol (100mg/dia) ou fluconazol (150mg/semana) terbinafina (250mg/dia), fungicida da classe das alaminas e vem sendo empregada com frequência (Arruda e Martinelli, 1997; D'Alessandro, 2000). O tratamento tópico à base de derivados imidazólicos, em forma de spray ou loção, pode ser utilizado duas vezes ao dia, complementando a terapêutica oral (Lacaz *et al.*, 1991; Sidrim e Moreira, 1999).

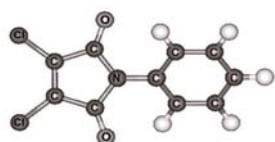
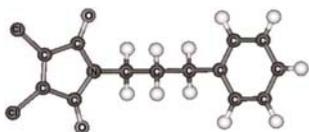
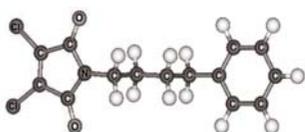
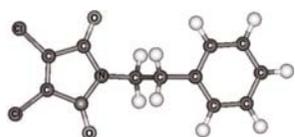
Tendo em vista a importância em saúde pública que *T. capitis* possui, torna-se valioso o encontro de novas alternativas para o seu tratamento. Conforme Calixto *et al.* (1998), os produtos naturais, precisamente os constituintes derivados de plantas, têm sido uma rica fonte de drogas e sabe-se que em grande parte, 30 a 40%, dos medicamentos utilizados na medicina moderna são direta ou indiretamente derivados da natureza. Nos últimos anos muitos trabalhos têm sido desenvolvidos quanto às várias e importantes propriedades biológicas das imidas cíclicas, substâncias similares ao alcalóide filantimida obtida de *Phyllanthus sellowianus* família *Euphorbiaceae* (Andricopulo *et al.*, 1998; Corrêa *et al.*, 1996; Cechinel

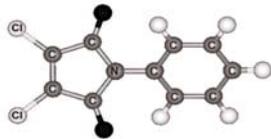
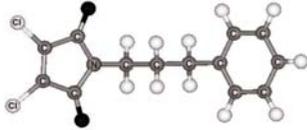
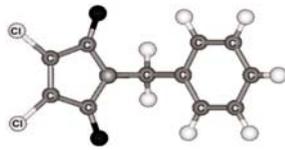
Recebido em 14/8/2003

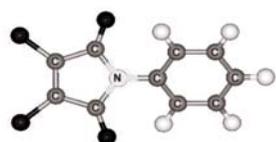
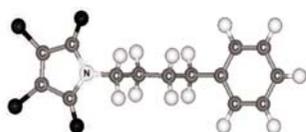
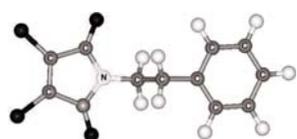
Aprovado em 15/8/2003

¹Dermatologista de Hosp. Universitário Lauro Wanderley/Universidade Federal da Paraíba; ² Lab. de Micologia/Departamento de Ciências Farmacêuticas/CCS/UFPB

³ Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas/Universidade do Vale do Itajaí; ⁴ Departamento de Química/Universidade do Vale do Itajaí





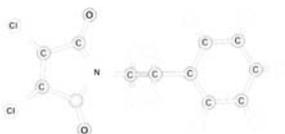


Filho, 1995; Cechinel Filho *et al.*, 1994). Conforme os estudos realizados e registrados na literatura (Calixto *et al.*, 1984; Santos *et al.*, 1994; Cruz *et al.*, 1996; Cechinel Filho *et al.*, 1994; Cechinel Filho *et al.*, 1995; Corrêa *et al.*, 1996.; Corrêa *et al.*, 1997; Andricopulo *et al.*, 1998; Lima *et al.*, 1999), alguns componentes desse grupo de substâncias têm revelado importante e expressivo efeito analgésico, antiespasmódico, antibacteriano, antifúngico, dentre outros.

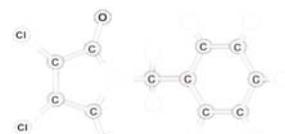
Portanto, faz-se mister estudar de forma consolidada o potencial antifúngico existente nos compostos sintéticos, no caso as maleimidias. Importa que sejam antifúngicos potentes, que possam ser usados para a produção de fármacos eficientes, seguros, estáveis e com pouca ou nenhuma toxicidade ao hospedeiro.

MATERIAL E MÉTODOS

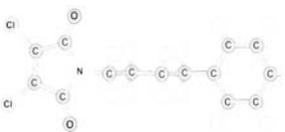
Maleimidias: as maleimidias foram caracterizadas quimicamente e fornecidos pelo Prof. Dr. Valdir Cechinel Filho do Núcleo de Investigações Químico-Farmacêuticas (NIQFAR) da Universidade do Vale do Itajaí (SC). As maleimidias que tiveram seu espectro de ação antifúngica estudado foram:



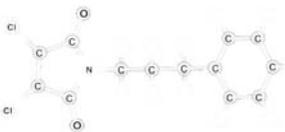
3,4-dicloro-*N*-fenil-etil-maleimida



3,4 dicloro-*N*-fenil-etil-maleimida



3,4-dicloro-*N*-fenil-butil-maleimida



3,4-dicloro-*N*-fenil-propil-maleimida

Espécies fúngicas: para os testes *in vitro* da atividade antifúngica dos compostos imídicos foram utilizadas 20 cepas de dermatófitos dos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton*, isolados de escamas e pêlos do couro cabeludo de pacientes com diagnóstico de *Tinea capitis*. Incluíram: três de *M. canis*, uma de *T. mentagrophytes*, oito de *T. rubrum*, quatro de *T. tonsurans* e quatro de *T. verrucosum*. As cepas foram mantidas em ágar Sabouraud dextrose a 2% (Difco Laboratories Ltda., Detroit, USA), preparado a 4°C. A partir das cepas selecionadas, foram preparados inóculos em solução fisiológica a 0,85% esterilizada (Odds, 1989; Benoudia *et al.*, 1988). As suspensões foram preparadas e comparadas com a suspensão de sulfato de bário do tubo 0,5 da escala de McFarland, sendo feita contagem celular em câmara de Neubauer, ajustada no espectrofotômetro (Leitz-Photometer 340-800) para conter aproximadamente 10⁶UFC/ml (Csals, 1979; Fromtling *et al.*, 1983; Drutz, 1987).

Estudo da atividade antifúngica: inicialmente foram preparadas soluções de diferentes concentrações dos compostos imídicos. Este procedimento foi executado da seguinte forma: em tubo estéril foi adicionado 600µg do produto, 0,03ml de DMSO e q.s.p. 3ml de água destila-

da estéril, sendo agitado por meio de um agitador de tubos. Seguindo-se a diluição seriada, onde cada tubo estéril seguinte continha 1,5ml de água destilada estéril, adicionada de 1,5ml da concentração anterior, sendo agitado; procedendo desta forma, para no final obter-se as concentrações desejadas: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,3 e 3,1µg/ml. A partir deste procedimento foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de cada composto. A atividade antifúngica das maleimidias foi determinada pelo método de difusão em meio sólido, processo cavidade em placas (McGinnis, 1980; Shadomy *et al.*, 1985; Pemplel *et al.*, 1986; Benoudia *et al.*, 1988; Cleeland e Sequires, 1991; Hadacek e Greger, 2000). Em placas de Petri (10 x 16mm) estéreis, foi colocado 1ml da suspensão do inóculo do microrganismo. Em seguida, adicionou-se 20ml do meio sólido fundido a 45-50°C. Após solidificação do meio de cultura, foram feitas cavidades com cânulas de vidro (6mm de diâmetro), seguindo-se pela deposição de 50µl do composto imídico em suas diversas concentrações.

Foram executados procedimentos controle com o cetoconazol (50µg/ml), de viabilidade das cepas de dermatófitos testadas, e com o DMSO.

Cada ensaio foi realizado em duplicata frente a cada cepa selecionada, sendo incubados durante 10-14 dias a temperatura ambiente (28-30°C). O resultado final foi determinado pela média aritmética dos halos da inibição dos valores obtidos nos dois ensaios. Foi considerado como possuidor de atividade antifúngica aquele composto que quando da sua aplicação sobre o meio de cultivo inóculo com a suspensão do microrganismo apresentou a formação de um halo de inibição igual ou maior que 10mm de diâmetro (McGinnis, 1980; Shadomy *et al.*, 1985; Pemplel *et al.*, 1986; Benoudia *et al.*, 1988).

RESULTADOS

Foi avaliado o potencial antifúngico das maleimidias 3,4-dicloro-*N*-fenil-etil-maleimida, 3,4-dicloro-*N*-benzil-maleimida, 3,4-dicloro-*N*-fenil-butil-maleimida, 3,4-dicloro-*N*-fenil-propil-maleimida, 3,4-dicloro-*N*-fenil-maleimida sobre o crescimento dos dermatófitos *Microsporum* e *Trichophyton*. Os resultados destes ensaios encontram-se registrados na Tabela I.

As imidas, de modo geral, apresentaram excelente atividade antifúngica sobre cepas de *Microsporum* e *Trichophyton*. A imida 3,4-dicloro-*N*-fenil-maleimida na concentração de 50µg/ml inibiu o crescimento de 16 (80%) cepas de *Trichophyton*, com halos de inibição entre 10 a 18mm de diâmetro. De outra forma, *M. canis* foi resistente à referida maleimida em suas variadas concentrações. O composto 3,4-dicloro-*N*-benzil-maleimida, a 25µg/ml, foi ativo sobre 14 (70%) cepas do gênero *Trichophyton*, onde a média dos halos de inibição foi de 14mm de diâmetro.

A maleimida 3,4-dicloro-*N*-fenil-butil-maleimida, dentre as cinco imidas, apresentou a CIM a 100µg/ml, inibindo o crescimento de 15 cepas (75%) de *Microsporum* e *Trichophyton*. Os tamanhos dos halos de inibição produzidos decorrentes a ação deste composto oscilaram entre 10 a 20mm de diâmetro. Ressalta-se que, das cinco maleimidias testadas, a 3,4-dicloro-*N*-fenil-propil-maleimida apresentou a menor CIM, pois a 12,5 µg/ml, inibiu o crescimento de 17 (85) cepas de *Microsporum* e *Trichophyton*, sendo a média dos halos de inibição 17mm

TABELA I

Média dos halos de inibição (mm) observados no estudo da atividade antifúngica de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das maleimidias contra dermatófitos isolados de *Tinea capitis*

Maleimidias	CIM (µg/ml)	Cepas de dermatófitos																			
		<i>M. canis</i> - 8	<i>M. canis</i> - 15	<i>M. canis</i> - 828	<i>T. mentagrophytes</i> -5	<i>T. rubrum</i> - 1	<i>T. rubrum</i> - 2	<i>T. rubrum</i> - 3	<i>T. rubrum</i> - 6	<i>T. rubrum</i> - 9	<i>T. rubrum</i> - 13	<i>T. rubrum</i> - 14	<i>T. rubrum</i> - 16	<i>T. tosurans</i> - 4	<i>T. tosurans</i> - 766	<i>T. tosurans</i> - 783	<i>T. tosurans</i> - 819	<i>T. verucosum</i> - 40	<i>T. verucosum</i> - 11	<i>T. verucosum</i> - 947	<i>T. verucosum</i> - 952
3,4-dicloro- <i>N</i> -fenil-etil-maleimida	50	R	R	R	R	13	12	15	12	12	12	12	10	15	18	16	16	17	18	14	16
3,4-dicloro- <i>N</i> -benzil-maleimida	25	R	R	R	R	13	10	12	R	13	R	11	12	17	15	12	12	15	17	12	13
3,4-dicloro- <i>N</i> -fenil-butil-maleimida	100	R	16	10	R	10	10	10	R	R	12	10	12	13	12	12	12	14	20	R	16
3,4-dicloro- <i>N</i> -fenil-propil-maleimida	12,5	R	12	11	R	15	17	15	10	12	12	14	14	14	15	14	10	15	16	R	10
3,4-dicloro- <i>N</i> -fenil-maleimida	25	R	R	R	R	13	10	14	12	12	12	12	12	12	10	12	15	18	20	13	20
Controle com o microrganismo		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle com DMSO		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Controle com Cetoconazol (50µg/ml)		22	20	36	30	38	30	30	36	38	24	20	36	18	24	R	26	24	10	20	R

R= resistência ao produto testado; += crescimento do microrganismo no meio de cultivo sem adição de compostos que tem sua atividade antifúngica testada.

de diâmetro. A maleimida 3,4-dicloro-*N*-fenil-maleimida, até a concentração de 25µg/ml, produziu atividade antifúngica sobre o crescimento de 16 (80%) cepas do gênero *Trichophyton*, sendo que a média dos halos de inibição foi 15mm de diâmetro. As cepas do gênero *Microsporum* foram totalmente resistentes a essa maleimida até a concentração de 200µg/ml.

DISCUSSÃO

Tinea capitis constitui uma entidade nosológica responsável pela infecção fúngica do pêlo e/ou do couro cabeludo. Desta forma, merece considerado destaque na esfera das micoses de importância clínica, uma vez que está envolvida com fatores sociais e sanitários da população. Lima *et al.* (1999), quando estudaram a frequência de dermatofitoses em João Pessoa-PB, Brasil, observaram que *T. capitis* foi a segunda mais frequente dentre as demais tineas. De um modo geral, este dado reforça a importância que possui esta micose.

As infecções causadas por agentes fúngicos têm-se elevado a partir de 1980 e, conseqüentemente, com isso, houve concomitante aumento da busca de alternativas hábeis de utilização na terapêutica das mesmas. Assim, há necessidade de estudos para a investigação de novos produtos que possam ser eficientes e com pouca ou nenhuma toxicidade e que possam ser utilizados na terapêutica das infecções fúngicas causadas pelos gêneros *Trichophyton* e *Microsporum* (Aste *et al.*, 1991; Grabill, 1992; Hazen, 1995). Dentro desse contexto têm sido estudadas muitas classes de compostos químicos, incluindo as imidas cíclicas.

Os compostos imídicos, em especial as maleimidias,

são substâncias sintéticas e similares ao alcalóide filantimida, obtido da espécie vegetal *Phyllanthus sellowianus*, da família Euphorbiaceae (Calixto *et al.*, 1998). São bastante conhecidas por suas propriedades biológicas, incluindo ações sedativas, hipnóticas, anticonvulsivantes, hipotensoras, diuréticas, analgésicas, bactericidas, fungicidas, inseticidas, etc (Cechinel Filho *et al.*, 1998; Cechinel Filho, 1995; Andricopulo, 1996).

O estudo da atividade antifúngica de compostos imídicos contra dermatófitos isolados de *T. capitis* foi fundamentado em parâmetros que elencam, além da importância clínica da micose, os avanços científicos nos estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, os quais têm contribuído para a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas.

No presente trabalho, o perfil de sensibilidade dos dermatófitos testados perante as maleimidias, na concentração de 200µg/ml, foi em torno de 90%, com halos de inibição sobre o crescimento dos microrganismos que variaram de 10 a 35mm de diâmetro.

Dentre as maleimidias avaliadas, destacou-se a 3,4-dicloro-*N*-fenil-propil-maleimida, pois, evidenciou intensa atividade antifúngica contra as cepas testadas, onde sua CIM foi 12,5µg/ml. Todavia, as demais maleimidias também foram eficientes, com suas CIMs de 25 a 100µg/ml.

A atividade antifúngica produzida pelas maleimidias sobre o crescimento de cepas de *Microsporum* e *Trichophyton* parece promissora, pois entre os seus principais efeitos biológicos, está incluído o antimicrobiano. Os resultados observados e registrados nesse trabalho confirmam aqueles obtidos por Cechinel Filho *et al.* (1994) e Lima *et al.* (1999). Os autores estudaram a

atividade antimicrobiana de compostos maleimídicos sobre bactérias e fungos, onde *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *M. canis* e *Penicillium* foram sensíveis aos referidos compostos em concentrações similares.

Os resultados do perfil de sensibilidade dos dermatófitos *Microsporum* e *Trichophyton* às maleimidas, com CIMs entre 12,5 a 100µg/mL, corroboram com os relatados por Dantas *et al.* (2000), quando avaliou a susceptibilidade em espécies de *Candida* frente às maleimidas, naftalimididas e succinimididas. Foi verificado que somente as maleimidas produziram inibição sobre o crescimento de 40% das leveduras usadas nos ensaios microbiológicos, pontuando o potencial antifúngico desses compostos. Deve ser ressaltado que os dermatófitos apresentaram uma sensibilidade bem superior aos observados com as espécies *Candida*, pois 70 a 80% das cepas de *Microsporum* e *Trichophyton* apresentaram-se sensíveis às maleimidas.

Cechinel Filho *et al.* (1994) e Cruz *et al.* (1996) fizeram uma avaliação da atividade antibacteriana de imidas cíclicas, incluindo *N*-fenilmaleimididas e *N*-arildicloromaleimididas, contra *S. aureus*, *E. coli* e *Salmonella typhimurium*. Os autores verificaram que somente as maleimidas produziram atividade. Tais resultados, acréscimos dos registrados neste estudo, ressaltam a atividade antimicrobiana presente nestas substâncias e enaltecem a importância, dentro do panorama de possibilidade terapêutica, que estes produtos vêm adquirindo.

A sensibilidade dos dermatófitos às maleimidas também encontram-se compatíveis com os resultados obtidos por Lima *et al.* (2002), quando testaram a atividade antifúngica de cepas de *Malassezia furfur* a compostos imídicos. Tal estudo detectou que as maleimidas apresentaram excelente atividade inibitória sobre *M. furfur*.

Poder-se-á, por meio deste estudo e dados registrados na literatura, confirmar o potencial antifúngico das maleimidas. Seus efeitos biológicos e de compostos relacionados vêm sendo estudados há muitos anos, especialmente, os efeitos antifúngicos e antibacterianos, os quais se encontram relacionados com a dupla ligação do anel imídico, ou ao átomo de N próximo ao anel benzeno, que pode acarretar uma interação eletrônica entre a molécula e o microrganismo testado (Cechinel Filho *et al.*, 1994; Cechinel Filho *et al.*, 1998; Dantas *et al.*, 2000). São compostos de fácil obtenção, com bons rendimentos e da necessidade de novos fármacos para o tratamento de muitas patologias. As maleimidas possuem perfil para o desenvolvimento de novos e potentes fármacos.

REFERÊNCIAS

1. Abraham, A.M.L.; Gómez, A.L.B.; Andreu, C.F. Aislamiento de dermatofitos a partir de niños sin signos clínicos de dermatofitose. *Rev. Cub. Med. Trop.* 38(2):147-150, 1986.
2. Andricopulo, A.D.; Willain-Filho, A.; Corrêa, R.; Santos, A.R.S.; Nunes, R.J.; Yunes, R.A.; Cechinel Filho, V. Analgesic activity of 3,4-dichlorine-maleimides: structure activity relationships. *Pharmazie*. 53:493-498, 1998.
3. Andricopulo, A.D. Síntese de compostos *N*-aril e *N*-alquilrimidimídicos cíclicos. Correlação entre estrutura química e atividade farmacológica. Dissertação de Mestrado. UFSC, Florianópolis - SC, 1996. 78p.
4. Arruda, L.H.F.; Martelli, F. *Tinea capitis* em crianças: repilação total em poucos meses após tratamento com terbinafina. *Dermatologia*. 4:11-15, 1997.
5. Aste, N.; Pau, M.; Pinna, A. L.; Colombo, M. D.; Biggio, P. Clinical efficacy and tolerability of terbinafine in patients with *Pytiriase versicolor*. *Mycoses* 34: 353-357, 1991.
6. Benoudia, A.; Hassar, M.; Benjilali, B. Les propriétés antiséptiques des huiles essentielles *in vitro*, testées contre des germes pathogenes hospitaliers. *Fito-terapia*. 59(2) :115-119, 1988.

7. Casals, J.B. Tablet sensitivity testing of pathogenic fungi. *J. Clin. Pathol.*32:719-722, 1979.
8. Calixto, J.B.; Yunes, R.A.; Neto, A.S.O; Valle, R.M.R.; Era, G.A. Antispasmodic effects of an alkaloid extracted from *Phyllanthus sellowianus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 17:313-321, 1984.
9. Cechinel Filho, V.; Corrêa, R.; Vaz, Z.; Calixto, J.B.; Nunes, R.J.; Pinheiro, T.R.; Andricopulo, A.D.; Yunes, R.A. Further studies on analgesic activity of cyclic imides. *IL Farmaco*. 53:55-60, 1998.
10. Cechinel Filho, V. Obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de produtos naturais. Correlação estrutura química-atividade biológica. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Santa Catarina. 1995. 126p.
11. Cechinel Filho, V.; Bella Cruz, A.; Nunes, R.J.; Yunes, R.A.; Moretto, E.; Gonzaga, L.; Corrêa, R.; Yunes, R.A. Atividade antimicrobiana de análogos da filantimida. *Rev. Latinoamer. Quim.* 23:116122, 1994.
12. Cechinel Filho, V.; Pinheiro, T.; Nunes, R. J.; Yunes, R.A.; Cruz, A. B.; Moretto, E. Antibacterial activity of *N*-phenylmaleimides, *N*-phenylsuccinimides and related compounds. Structure – activity relationships. *II Farmaco*. 49 (10): 675-677, 1994.
13. Cleeland, R.; Squires, R. Evaluation of new antimicrobials “in vivo” and in experimental animal infections. In: Lorian, V. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 3rd ed. Baltimore: Williams & Williams, 1991.
14. Corrêa, R.; Cechinel Filho, V.; Rosa, P.W.; Pereira, C.L.; Schlemper, V.; Nunes, R.J. Synthesis of new succinimides and sulphonated derivatives with analgesic action in mice. *Pharmaceutical Sciences*. 3:67-71, 1997.
15. Corrêa, R.; Rosa, P.W.; Bella Cruz, A.; Savi, A.O.S.; Cechinel Filho, V.; Nunes, R.J. Synthesis and antibacterial activity of citraconimides. *Pharmaceutical Sciences*. 2:353-355, 1996.
16. Crissey, J. T.; Lang, H.; Parish, L. C. *Manual of Medical Mycology*. Cambridge: Blackwell Science. 1995. 263 p.
17. Cruz, A.B.; Cruz, R.C.B.; Cechinel Filho, V.; Júnior, D.A.; Nunes, R.J.; Yunes, R.A. Avaliação dos efeitos antibacterianos de *N*-arildicloromaleimididas e *N*-ariltalimididas. Relação estrutura-atividade. *Rev. Latinoamer. Quim.* 25910:10-13, 1996.
18. D'Alessandro, A. *Diagnóstico Micológico*. Buenos Aires: Medicina Panamericana, 1976.
19. Dantas, Z.M.R.; Lima, E.O.; Vasconcelos Filho, P.A.; Cechinel Filho, V. Susceptibilidade *in vitro* de espécies de *Candida* a maleimidas, naftalimididas e succinimididas. *Rev. Bras. Farm.* 81(1/2):31-35, 2000.
20. Drutz, D.J. *In vitro* antifungal susceptibility testing and measurement of levels of antifungal agents in body fluids. *Rev. Infect. Dis.* 9(2):392-397, 1987.
21. Fromting, R.A.; Pui-Yu, H.; Shadomy, S. *In vitro* inhibitory activities of 2 new orally absorbable imidazole derivatives: BAYN 7133 and BAYI 913. *Sabouraudia*. 21:179-184, 1983.
22. Graybill, J. R. Future directions of antifungal chemotherapy. *Clin. Infect. Dis.* 14(1): 5170-5181, 1992.
23. Hadacek, F.; Greger, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem. Anal.* 11: 137-147, 2000.
24. Hazen, K. C. New and emerging yeast pathogens. *Clin. Microbiol. Rev.* 8(4): 462-478, 1995.
25. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C. *Micologia Médica*. São Paulo: Sarvier, 1991.
26. Lima, E. O.; Queiroz, E. F.; Andricopulo, A.D.; Yunes, R.A.; Corrêa, R.; Cechinel Filho, V. Evaluation of antifungal activity of *N*-aryl-maleimides and *N*-phenylalkyl-3,4-dichlorine-maleimides. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 44(2):185-189, 1999.
27. Lima, E. O.; Queiroz, Belém, L. F.; Cechinel Filho, V.; Corrêa, R.; Nunes, R.J.; Andricopulo, A.; Silva, V. E. Avaliação da sensibilidade de cepas de *Malassezia furfur* a imidas cíclicas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 38(4): 443-450, 2002.
28. Lima, E. O.; Pontes, Z.B.V.S.; Oliveira, N.M.C.; Carvalho, M.F.F.P.; Guerra, M.F.L.; Santos, J.P. Frequência de dermatofitoses em João Pessoa - Paraíba - Brasil. *An. Bras. Dermatol.* 74(2):127-132, 1999.
29. McGinnis, M.R. *Laboratory handbook of medical mycology*. Academic Press, 1980.
30. Odds, F.C. Antifungal activity of saperconazole (R.66905) *in vitro*. *J. Antimicrob. Chemother.*24:533-537, 1989.
31. Plempel, M.; Berg, D.; Buchel, D.B.; Abbink, D. Test methods for antifungal agents – a critical review. *Mykosen*. 30(1):28-34, 1986.
32. Santos, S.A.R.S.; Cechinel Filho, V.; Niero, R.; Vianna, A.M.; Moreno, I.N.; Campos, M.M.; Yunes, R.A.; Calixto, J.B. Analgesic effects of callus culture extracts from selected species *Phyllanthus* in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* 46:755-759, 1994.
33. Saurat, J.H.; Grosshans, E.; Laugier, P.; Lachapelle, J.M. *Dermatologie et Vénérologie*. Masson, 1990.
34. Shadomy, S.; Espinel-Ingroff, A.; Gebhar, R.J. *In vitro* studies with sf 86–327, a new orally active allylamine derivatives. I. *Med. Vet. Mycol.* 23:125-132, 1985.

Endereço para correspondência
 Dr^ª Edeltrudes de Oliveira Lima
 Laboratório de Micologia/DCF/CCS/UFPb
 Campus Universitário I - João Pessoa, Pb - 58059-900
 Telef. (0xx83)216-7094
 E-mail: eolima@ccs.ufpb.br

Avaliação dos pacientes submetidos à quantificação de células CD34⁺ por citometria de fluxo*

Patients' avaliation submitted to quantification of CD34⁺ cells therapy by flow cytometry

Renata da Silva¹; Sílvia I. A. C. P. Ferreira²; Anália S. Cordoba³ & Patrícia Haas⁴

RESUMO – O número absoluto de células CD34⁺ em sangue periférico permite prever o momento ideal de coleta das células-tronco periféricas, oferecendo segurança para a realização do transplante autólogo de medula óssea. A citometria de fluxo, através de um fluxo laminar, permite a análise e quantificação destas células baseada numa plataforma única. No presente trabalho foram considerados 62 pacientes, submetidos à terapia de mobilização e quantificação de células CD34⁺, internados na Unidade de Transplante Medula Óssea do Hospital Governador Celso Ramos, em Florianópolis. As análises foram feitas no Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC).

PALAVRAS-CHAVE – Células CD34⁺, citometria de fluxo, transplante autólogo de medula óssea.

SUMMARY – The absolute number of CD34⁺ cells in peripheral blood allows to predict the ideal moment of the collection of peripheral blood stem cells, offering security in autologous transplant of bone marrow. Flow cytometry, through a laminar flow, allows the analysis and quantification of these cells based on an exclusive platform. In this work, 62 patients underwent the mobilization and quantification of cells CD34⁺ therapy, were interned in the Unit of TMO at the "Hospital Governador Celso Ramos" in Florianópolis. The analysis were made at the "Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina"(HEMOSC).

KEYWORDS – CD34⁺ cells, flow cytometry, autologous bone marrow transplant.

INTRODUÇÃO

Uma década se passou desde o primeiro relato de um transplante autólogo de medula óssea (ATMO), realizado com sucesso, utilizando célula progenitora de sangue periférico (PBPC). Estas células foram obtidas de pacientes que fizeram uso de fator estimulador de colônia granulocítica-monocítica (GM-CSF) para acelerar a recuperação da citopenia induzida por altas doses de ciclofosfamida (CY). Atualmente, as PBPC têm sido utilizadas na recuperação das células-tronco derivadas da medula óssea, indicando uma segura reconstrução hematopoiética após altas doses de quimioterapia (HDC) em uma variedade de malignidades. A substituição da medula óssea por PBPC ocorreu, principalmente, pela observação da mais rápida realização do transplante com PBPC do que com a medula óssea (Alcorn *et al.*, 2000).

Está bem estabelecido que 1% das células da medula óssea expressam o antígeno CD34⁺, uma pesada estrutura glicosilada *mucin like*, capazes de reconstituir por um longo período a multilinhagem hematopoiética após terapias mielobláticas. O CD34⁺ é o primeiro antígeno de superfície celular, cuja expressão dentro do sistema hematopoiético, é restrita às células-tronco e progenitoras para todas as linhagens. Deste modo, as células progenitoras CD34⁺ podem restaurar a multilinhagem hematopoiética (Berenson *et al.*, 1988; Andrews *et al.*, 1992; Gratama *et al.*, 1998).

Células CD34⁺ também podem ser encontradas em sangue periférico de indivíduos normais, mas são ex-

tremamente raras (aproximadamente 0,01-0,05% do total de células nucleadas). Entretanto, tratamentos atuais e regimes de mobilização, incluindo quimioterapia e/ou fatores de crescimento hematopoiéticos, podem incrementar significativamente a circulação de células-tronco CD34⁺ em pacientes e doadores saudáveis (Barnett *et al.*, 1999).

Doses terapêuticas elevadas com o suporte das PBPC é uma opção terapêutica utilizada em pacientes em condições de malignidade hematopoiética ou não hematopoiética. A mobilização de um número suficiente destas células progenitoras vindas da medula óssea para a circulação, coletadas por leucoferese e armazenadas, é muito comumente utilizada com êxito. É combinada à quimioterapia citotóxica utilizando fatores de crescimento como o fator estimulador de colônia granulocítica (GM-CSF), ou o fator estimulador de colônia granulocítica-monocítica (GM-CSF). A coleta adequada das PBPC tem sido variadamente avaliada em seu produto final contendo células nucleadas; células mononucleadas; unidades formadoras de colônia granulocítica e monocítica ou células CD34⁺ (Elliott *et al.*, 1996).

Vantagens potenciais do transplante utilizando PBPC incluem uma mais rápida reconstrução hematopoiética, baixo risco de contaminação por células tumorais, redução de custos hospitalares, aumento do número de linfócitos T e células NK que podem reduzir muito a recaída pós-transplante e a eliminação da necessidade de anestesia geral. Adicionalmente, as PBPC finais são, além disso, mais adequadas para a manipulação *ex vivo*, da mesma forma que as células selecionadas

Recebido em 4/4/2003

Aprovado em 8/8/2003

*Laboratório de Marcadores Celulares do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina, Florianópolis/SC e Univ. Fed. de Santa Catarina

¹Acadêmica do Curso de Farmácia/Análises Clínicas/UFSC; ²Médica Patologista/HEMOSC; ³Bióloga/HEMOSC; ⁴Prof^o do Dept^o de Anál. Clín./UFSC

CD34⁺, tumores purificados e transferência genética (Barnett *et al.*, 1999).

A citometria de fluxo é um método largamente utilizado para a enumeração de células CD34⁺ que serão consideradas representativas para a população de células-tronco e são capazes de reconstituir por um longo tempo a multilinhagem hematopoiética pós-quimioterapia. O fenótipo das PBPC humanas tem sido definido como CD34⁺ CD38⁻, e negativo para marcadores de maturidade hematopoiética. Centros de transplante rotineiramente confiam na quantificação de células CD34⁺ por citometria de fluxo para a determinação em tempo ótimo e para confirmar a colheita das PBPC (Ross *et al.*, 1995; Hubl *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2000).

A enumeração por citometria de fluxo das células progenitoras por quilograma de peso corporal do receptor, tem sido muito utilizada como indicador da capacidade de reconstituição hematopoiética das PBPC transplantadas. Tal técnica pode produzir resultados em horas, avaliação em série das concentrações de células CD34⁺ no sangue periférico, além de permitir a otimização do tempo das sessões de aférese, assegurando a colheita suficiente de células CD34⁺ (Gratama *et al.*, 1999).

Por causa das diferentes vantagens observadas, muitos centros hemoterápicos estão realizando transplantes autólogos de medula óssea com o uso as PBPC, e o resultado desta mudança na prática é o uso cada vez mais comum e aumentado de pacientes pela terapia de mobilização com subsequente leucoaférese. Para uma eficiência operacional e financeira seria claramente vantajoso se, suficientes PBPCs pudessem ser obtidas em uma coleta e que a época ótima desta única leucoaférese pudesse ser de prognóstico confiável (Elliott *et al.*, 1996).

OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi fazer uma avaliação epidemiológica dos pacientes submetidos à mobilização e quantificação de células CD34⁺, eventualmente encaminhados ao transplante de medula óssea autólogo, sendo que, as análises foram realizadas no Laboratório de Marcadores Celulares, do Centro de Hematologia e Hemoterapia de Santa Catarina (HEMOSC).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostra: foram selecionados 62 pacientes no período de abril de 2000 à abril de 2002 com os seguintes diagnósticos hematológicos: Leucemia Mielóide Aguda (LMA), Linfoma Hodgkin (LH), Linfoma não Hodgkin (LNH) e Mieloma Múltiplo (MM).

Os pacientes foram eleitos ao transplante de medula óssea após avaliação de critérios gerais e específicos para cada diagnóstico. Dentre os critérios gerais de exclusão incluem: idade inferior a 15 anos e superior a 60 anos, exceção a pacientes com MM aceitos até 65 anos; presença de malignidade concomitante; presença de patologia psiquiátrica; presença de doença respiratória crônica e, finalmente, anormalidades de funções cardíaca, hepática e renal (Portaria MS/1.217).

As células progenitoras foram mobilizadas nestes pacientes, utilizando-se uma variedade de regimes quimioterápicos seguido da prescrição subcutânea do fator de crescimento G-CSF ou GM-CSF (5mg/kg/dia) por 5 dias consecutivos, antecedentes à coleta. Após

este período foi monitorada a leucometria dos pacientes. Quando o número de leucócitos estava entre 3.000 – 4.000/mm³, nos casos de LMA, ou acima de 1.000/mm³, nos casos de MM, LH, LNH, iniciaram-se as contagens de células CD34⁺ em amostras de sangue periférico (Alcorn *et al.*, 2000).

O número de células CD34⁺ em sangue periférico foi monitorado para se determinar o momento ótimo de coleta da aférese, que continha maior concentração de células progenitoras. Este sangue periférico foi obtido por punção venosa e diluído em 0.34 M do sal di- ou tri-, potássico do ácido etilenodiaminotetracético (K₂EDTA ou K₃EDTA) (Barnett *et al.*, 1999).

As leucoaféreses foram obtidas em torno do quinto dia em equipamento COBE Spectra (Cobe Laboratories, Quedgeley, U. K.), por procedimento de separação e diluídas com salina isotônica contendo solução A.C.D. (ácido cítrico, citrato dissódico e dextrose), como anti-coagulante (Alcorn *et al.*, 2000).

Metodologia: as células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos de três cores, do kit ProCOUNT (Becton Dickinson, USA) que permitiram a identificação e enumeração das células CD34⁺ por citometria de fluxo (Gratama *et al.*, 1999).

Foram realizados dois ensaios, sendo um teste e um controle. Ao ensaio teste adicionou-se 50μL de amostra, sangue periférico ou aférese e 20μL do reagente constituído por *Nucleic acid dye*, um corante de leucócitos e células eritróides nucleadas que permite a eliminação de eventos não nucleados como os fragmentos, eritrócitos maduros e plaquetas; o monoclonal CD34 de classe III (anti-HPCA-2) conjugado a ficoeritrina (PE) dirigido contra o epítotope da célula progenitora e o monoclonal CD45 (Anti-Hle-1) conjugado à proteína piridina clorofila (PerCP) dirigido contra as células leucocitárias sendo sua expressão mais fraca nas células progenitoras, o que auxilia na identificação (Ward *et al.*, 1997).

Ao ensaio controle foram adicionados 50μL de amostra, sangue periférico ou aférese, e 20μL do reagente constituído por *Nucleic acid dye*; o monoclonal de controle isotípico (IgG1) dirigido contra um antígeno não expressado em células humanas conjugado a PE, constituindo assim, um controle negativo e o CD45 PerCP. Em ambos os ensaios, teste e controle, foram utilizados tubos *Tru Count*. Estes possuem em seu fundo um *pellet* liofilizado, com um número conhecido de pérolas fluorescentes, que permitem uma referência interna sobre a contagem total de células obtidas (Ward *et al.*, 1997).

Uma vez marcadas com estes reagentes, as células foram incubadas por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 450μL de uma solução lisante de células eritrocitárias, voltando a serem incubadas por trinta minutos (Ward *et al.*, 1997).

Após este período, estavam prontas para a aquisição no citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, San José, CA, USA), não sendo necessário o procedimento de lavagem. Foram obtidos um mínimo de 60.000 eventos, tanto no tubo teste como no tubo controle. A análise dos dados foi realizada a partir de histogramas do programa *ProCount* (Becton Dickinson, USA) (Gratama *et al.*, 1999).

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio dos programas Excel (Microsoft, 1997) e Epi Info (CDC, versão 6.04 a, 1996).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os sessenta e dois pacientes submetidos à terapia de mobilização na unidade de Transplante de Medula Óssea (TMO) do Hospital Governador Celso Ramos, de Florianópolis, Santa Catarina, são procedentes de diferentes municípios do estado, como mostra o Gráfico 1. A maior parte deles é proveniente da capital, seguida dos municípios de Balneário Camboriú e Criciúma, respectivamente 10; 4 e 4 pacientes.

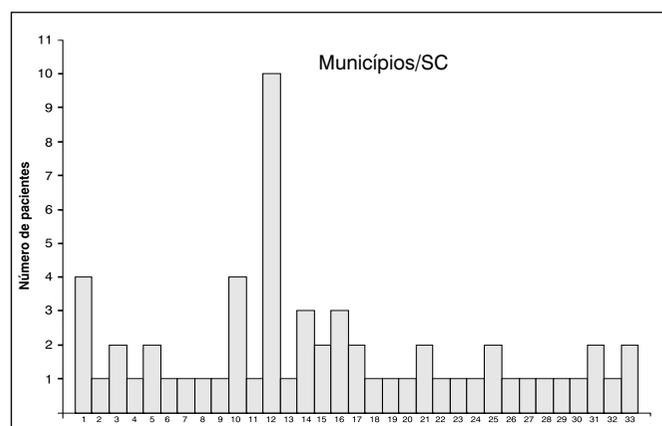
Predominaram os pacientes do sexo masculino (65%), em faixa etária de 41 à 50 anos (26%), como mostram os gráficos 3 e 4. Não existem critérios de escolha para o ATMO em relação ao sexo; entretanto quanto à idade há restrições. Segundo a Portaria n.º 1.217, de 13 de outubro de 1999, do Ministério da Saúde, são indicados ao transplante autogênico de medula os pacientes com idade inferior a 60 anos, exceto os com MM, 65 anos.

Deste total de pacientes, 30% tiveram diagnóstico de MM, 26% de LMA, outros 26% de LH e por último 18% de LNH (Gráfico 5), assim escolhidos com base nesta mesma portaria. Esta indica, como doenças: LMA em primeira ou segunda remissão; LNH agressivo em primeira recidiva quimiossensível; LH como "terapia de salvamento", excluindo pacientes que falharam há mais de dois esquemas terapêuticos e os casos de MM (Portaria MS/1.217).

Cinquenta e três (85%) dos pacientes submetidos à mobilização, receberam o transplante autólogo de células progenitoras, como mostra o Gráfico 2. Destes, 36 eram do sexo masculino, 17 do sexo feminino, com os seguintes diagnósticos: MM=18; LH=15; LMA=11 e LNH=9. A idade média foi de 42,1 (14-66) anos (Tabela I).

Existem muitas controvérsias na literatura quanto ao número de células CD34⁺ suficientes para a garantia do transplante de medula óssea, entretanto, há um consenso geral em que a dose mínima aceitável seja de 2,0 - 2,5 x 10⁶ células/Kg. Segundo Elliott, uma contagem pré-aférese de sangue periférico com o número de 20 células/ML indicaria, em aproximadamente 90% de pacientes, uma coleta acima de 2,0 x 10⁶ células/Kg (Elliott *et al.*, 1996; Alcorn *et al.*, 2000).

Desta forma, todos os pacientes submetidos ao

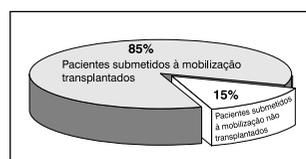


GRÁF. 1 - Procedência dos pacientes submetidos à mobilização, no período de 4/2000 à 4/2002 na unidade de TMO do Hospital Governador Celso Ramos: 1 - Balneário Camboriú; 2 - Biguaçu; 3 - Blumenau; 4 - Brusque; 5 - Caçador; 6 - Campo Alegre; 7 - Campos Novos; 8 - Canoinhas; 9 - Concordia; 10 - Criciúma; 11 - Curitiba; 12 - Florianópolis; 13 - Grão Pará; 14 - Itajaí; 15 - Imbituba; 16 - Itajaí; 17 - Jaguaruna; 18 - Jaraguá do Sul; 19 - Joinville; 20 - Lages; 21 - Laguna; 22 - Morro da Fumaça; 23 - Nova Trento; 24 - Orleans; 25 - Palhoça; 26 - Penha; 27/28 - Rio do Sul; 29 - Santo Amaro Imperatriz; 30 - São Camilo; 31 - São José; 32 - Trombudo Central; 33 - Tubarão

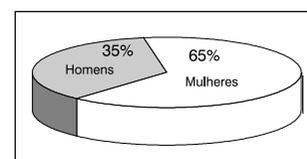
ATMO, realizaram a contagem das células-tronco periféricas, que indicou o melhor momento para a coleta, por procedimento de leucoaférese. A dosagem de células-tronco no sangue periférico, precedente à coleta, mostrou uma média de 69,97 (2,90-593,10) células CD34⁺/ML. A média de células tronco coletadas por procedimento de leucoaférese foi de 9,63 (0,26-61) x10⁶ células CD34⁺/Kg. Todos os pacientes receberam mais de 2,0x10⁶ células CD34⁺/Kg, no momento da infusão (Tab. I).

Nos 66 procedimentos analisados foi coletado um volume médio de 263,1(153-447) ml, por bolsa de procedimento de leucoaférese. Em 21 casos houve necessidade de mais de uma coleta, sendo que a maioria, 32 pacientes, realizaram apenas uma (Gráf. 6).

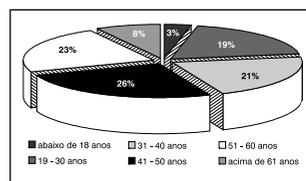
As melhores respostas em relação à mobilização, ocorreram nos casos de MM, com uma média de 18,92 (3,73-49) x10⁶ células CD34⁺/Kg coletadas. Seguiram os



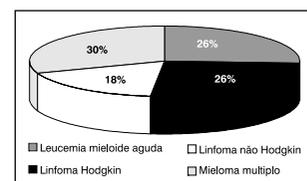
GRÁF. 2 - Pacientes submetidos à mobilização transplantados e não transplantados, no período de 4/2000 à 4/2002 na unidade de TMO do Hospital Governador Celso Ramos.



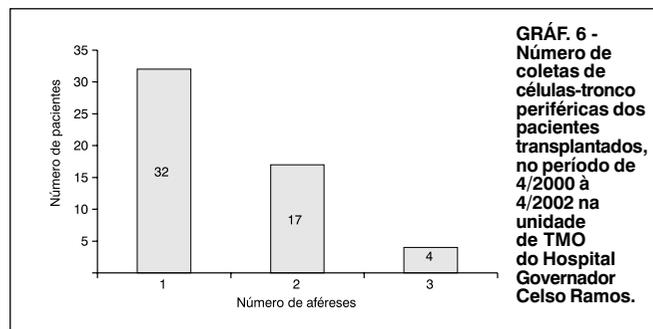
GRÁF. 3 - Sexo dos pacientes submetidos à mobilização, no período de 04/2000 à 4/2002 na unidade de TMO do Hospital Governador Celso Ramos.



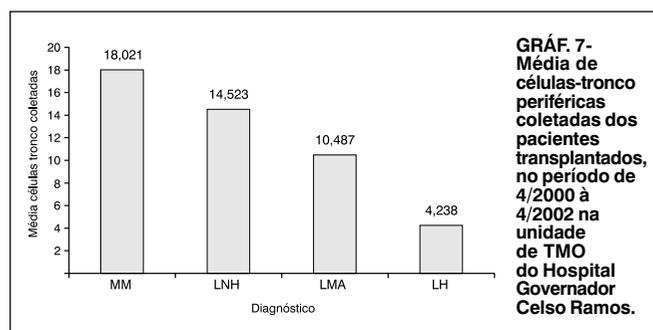
GRÁF. 4 - Faixa etária dos pacientes submetidos à mobilização, no período de 4/2000 à 4/2002 na unidade de TMO do Hospital Governador Celso Ramos.



GRÁF. 5 - Diagnóstico dos pacientes submetidos à mobilização, no período de 4/2000 à 4/2002 na unidade de TMO do Hospital Governador Celso Ramos.



GRÁF. 6 - Número de coletas de células-tronco periféricas dos pacientes transplantados, no período de 4/2000 à 4/2002 na unidade de TMO do Hospital Governador Celso Ramos.



GRÁF. 7 - Média de células-tronco coletadas dos pacientes transplantados, no período de 4/2000 à 4/2002 na unidade de TMO do Hospital Governador Celso Ramos.

TABELA I
Quantidade de células-tronco coletadas dos pacientes submetidos ao transplante autólogo de medula óssea
no período de 4/2000 à 4/2002 na unidade de TMO do Hospital Governador Celso Ramos

Dados dos pacientes						Sangue periférico			Aférese				
Nº	Data	Idade (anos)	Sexo	Peso (Kg)	Diagnóstico	Leucometria mm ³	CD34/μL	% CD34/CD45	Leucometria mm ³	Volume (ml)	CD34/μL	CD34x10 ⁵ /Kg	%CD34/CD45
1	15/09/2000	46	M	80,0	MM	4200	76,60	2,360	226200	251,0	2414,2	7,460	1,036
2	04/04/2001	48	M	84,0	LH	24300	18,00	0,088	40900	304,0	1002,2	3,620	0,103
3	31/05/2001	63	M	86	MM	13600	128,30	1,017	419200	273,0	10306,0	33,500	2,013
4	15/05/2001	33	M	66	LMA	6100	64,90	1,042	213600	284,0	3946,0	17,000	1,496
5	01/04/2002	50	M	85	LNH	7900	138,80	2,395	217800	244,0	7696,7	23,650	2,600
6	06/09/2001	54	M	64	MM	9700	106,90	1,258	422400	254,0	5631,1	22,350	1,152
7	26/07/2000	48	M	49,0	MM	8700	63,80	0,759	157200	263,0	1427,9	7,660	0,962
	27/07/2000	48	M	49,0	MM	12300	94,80	0,889	315700	230,0	1966,9	9,050	0,752
8	14/12/2000	37	M	67,0	MM	2700	226,00	5,090	188300	219,0	15074,0	49,000	6,140
9	05/12/2000	54	F	47,5	LMA	16400	21,70	0,094	164000	229,0	276,0	1,100	0,144
	06/12/2000	54	F	47,5	LMA	16200	9,70	0,074	200000	224,0	73,3	0,260	0,020
	12/12/2000	54	F	47,5	LMA	43600	16,00	0,046	373300	230,0	557,0	2,700	0,123
10	18/11/2000	54	F	60,0	LNH	31100	4,20	0,014	169800	222,0	126,3	0,500	0,103
	25/01/2001	54	F	60,0	LNH	17500	20,00	0,079	240000	279,6	556,0	2,600	0,170
	26/01/2001	54	F	60,0	LNH	11700	22,00	0,180	172000	316,5	141,4	44,700	0,125
11	20/06/2001	24	M	74	LMA	17500	406,80	3,803	648000	240,0	10299,0	35,310	2,466
12	08/12/2000	26	F	71,0	LH	8800	99,80	0,936	148000	232,0	278,0	1,000	0,360
13	22/03/2001	29	F	65	LH	30300	12,05	0,046	306000	313,0	486,0	2,300	0,096
14	19/03/2002	53	M	74	MM	6400	46,20	0,875	298800	267,0	2353,3	8,490	0,816
15	09/05/2000	28	F	49	LH	4200	16,00	0,030	41050	309,0	443,0	2,800	1,152
	10/05/2000	29	F	47,2	LH	5600	12,00	0,010	69000	272,0	313,0	1,700	0,514
16	29/04/2000	35	F	68,3	LMA	5200	44,14	0,074	180800	205,0	2527,0	7,400	1,430
17	12/11/2000	61	M	73,0	MM	5000	106,88	0,796	99000	205,0	2900,1	8,143	1,961
18	28/06/2001	57	M	59	LH	54300	65,50	0,157	390000	234,0	1343,6	5,330	0,315
19	02/08/2000	28	F	60	LMA	5200	59,10	1,249	111200	262,0	1619,2	7,070	1,593
20	12/05/2001	56	M	72	MM	11200	140,00	1,187	200400	304,0	4324,4	18,260	2,512
21	26/06/2000	24	M	61	LMA	16700	10,60	0,026	118800	277,0	448,0	2,000	0,180
	27/06/2000	24	M	61	LMA	19000	7,00	0,001	101600	289,0	44,9	0,260	0,057
	28/06/2000	24	M	61	LMA	21800	10,50	0,031	172000	283,0	473,8	2,200	0,124
22	09/03/2001	30	F	55	LH	33200	28,60	0,092	252000	253,0	1130,0	5,100	0,260
23	29/09/2000	66	M	48,5	MM	26400	46,90	0,115	244000	447,0	567,0	5,300	0,197
24	16/04/2001	54	M	71	MM	11200	433,00	2,952	262400	234,0	18632,0	61,000	4,970
25	26/04/2000	43	M	82,3	LMA	6000	142,00	2,341	113200	276,0	3739,0	9,700	2,380
26	05/04/2001	44	F	54	LNH	12100	55,80	0,463	239400	267,0	2705,8	13,400	1,017
27	19/12/2001	25	M	79	LNH	12800	38,00	0,298	414000	259,0	351,9	1,100	0,105
	19/12/2001	25	M	79	LNH	28000	32,80	0,132	310800	251,0	5855,7	18,600	1,573
28	09/02/2001	46	M	75,4	LNH	19800	58,00	0,315	254100	196,7	3218,2	8,400	1,302
29	13/06/2001	60	F	78	MM	29700	593,10	2,303	563200	246,0	8824,1	27,800	1,534
30	12/07/2001	48	M	75	MM	4900	79,00	2,313	308000	234,0	5743,5	17,900	1,695
31	28/06/2000	36	M	86	LMA	13800	9,70	0,084	117800	283,0	959,0	3,130	0,346
	29/06/2000	36	M	86	LMA	19900	11,60	0,201	111200	286,0	799,0	2,600	0,200
32	03/04/2002	52	M	72	MM	20700	64,70	0,238	300600	268,0	1196,1	4,450	0,437
33	01/10/2001	27	M	70	LH	33300	35,00	0,060	133000	282,0	984,3	3,700	0,656
34	17/04/2001	22	M	70	LH	9800	47,40	0,597	195600	275,5	1896,1	7,500	1,068
35	03/11/2000	54	F	58	MM	2200	71,00	4,241	84300	248,8	3283,5	14,090	3,331

Dados dos pacientes						Sangue periférico			Aférese				
Nº	Data	Idade (anos)	Sexo	Peso (Kg)	Diagnóstico	Leucometria mm ³	CD34/µL	% CD34/CD45	Leucometria mm ³	Volume (ml)	CD34/µL	CD34x10 ⁶ /Kg	%CD34/CD45
36	08/02/2001	32	M	82	LH	6300	55,00	0,980	310400	209,0	2567,0	6,500	0,655
37	26/01/2001	49	F	97	LNH	10200	9,40	0,100	162000	288,7	386,4	1,130	0,215
	28/01/2001	49	F	97	LNH	13000	6,75	0,055	112500	202,0	220,0	0,480	0,169
38	26/01/2001	54	M	50	MM	2300	2,90	0,135	33900	153,0	60,0	0,380	0,179
	29/01/2001	54	M	50	MM	17500	54,50	0,320	143200	280,0	1509,0	8,600	0,985
39	04/05/2000	19	F	49	LH	10200	24,50	0,193	212500	284,0	492,0	2,850	0,356
40	14/10/2001	35	F	58	LMA	14600	30,50	0,126	264000	247,0	2128,2	9,060	0,665
41	09/11/2001	18	M	51	LH	12100	28,40	0,250	344700	243,6	866,9	4,100	0,213
42	29/09/2000	41	M	78	LNH	24600	132,00	0,744	25400	371,0	2640,0	11,500	1,800
43	24/10/2000	28	F	69	LH	7700	12,60	0,195	188500	309,0	625,0	2,800	0,360
44	09/04/2001	40	M	90	LH	18800	21,80	0,100	201600	293,0	1470,0	4,700	0,485
45	16/04/2002	61	M	61	MM	7590	200,20	2,126	180000	264,0	972,7	4,210	0,763
46	20/08/2001	57	M	78	LH	2500	34,80	1,524	141000	260,0	1280,8	4,270	0,918
47	13/02/2002	40	M	87	LH	28500	24,13	0,070	350400	341,0	1358,0	5,300	0,310
48	14/04/2002	34	M	76,9	LNH	2700	14,9	0,799	126400	240,0	956,2	2,980	0,975
49	01/05/2001	14	F	52	LMA	5600	63,90	1,152	137200	276,0	2260,3	12,050	1,500
50	08/03/2002	46	M	84	MM	19700	35,70	0,162	292500	280,0	1118,1	3,730	0,373
51	24/03/2002	45	M	89	LNH	5000	15,20	0,480	176000	263,5	675,9	1,670	0,449
52	23/11/2001	54	M	84	LMA	22100	11,90	0,052	277200	274,0	1079,5	3,520	0,361
53	21/11/2000	47	F	52	MM	1900	28,00	1,750	120800	202,0	3343,5	13,000	2,586

diagnósticos de LNH=14,53 (1,61-130,71); LMA=10,49 (3,52-35,31); e finalmente LH=4,24 (1-7,50) x10⁶ células CD34⁺/Kg coletadas. (Gráfico 7).

Os outros nove pacientes (15%), dos pacientes submetidos à mobilização, não receberam a reinfusão das PBPC por uma variedade de causas. As de maior ocorrência foram a progressão da doença e a mobilização insuficiente destas células-tronco. Estas duas causas ocorreram em igual proporção (3 casos).

Segundo Osma, existe uma ampla variedade interindividual com respeito à capacidade para mobilizar células CD34⁺ desde a medula óssea até o sangue periférico e, por tanto, para sua coleta e características deste enxerto. Alguns fatores, além da concentração de células-tronco periféricas, poderiam prever esta mobilização, como a concentração basal de células CD34⁺, CD71⁻ (Osma *et al.*, 1999).

A mobilização insuficiente de células progenitoras ao sangue periférico e, conseqüente, não realização do procedimento de leucoaférese, ficou evidente em pacientes com LMA (3 casos), indicando mau prognóstico desta malignidade para a mobilização. Todos estes pacientes eram mulheres, tinham LMA, com idade média de 42,3 (39-48) anos.

A progressão da doença foi evidenciada em outros três pacientes. Apesar da mobilização ter ocorrido com êxito, 8,05; 2,93; 19,53 x10⁶ células CD34⁺/Kg coletadas, houve progressão da doença antes que as células fossem reinfundidas. Os diagnósticos foram de LMA, MM e LNH, respectivamente. Idade média de 46,3 (39-48) anos, sendo duas mulheres e um homem.

Em dois casos houve contaminação da bolsa por fungos, impossibilitando o procedimento de TMO e, finalmente, em um caso, de LMA, optou-se pelo congela-

mento das PBPC coletadas, só sendo realizada a infusão em caso de recaída da doença.

REFERÊNCIAS

1. **Alcorn J. M., Farrel E., Barr J., Pearson C., Green R., Holyoake T.**: The CD34+ Cells Mobilized Into the Peripheral Blood Can Predict the Quality of Subsequent Collections. *Journal of Hemotherapy & Stem cell research* 9:89-93, 2000.
2. **Andrews R. G., Byant E. M., Bartelmez S.H.**: CD34+ Marrow Cells, Devoid of T and B Lymphocytes, Reconstitute Stable Lymphopoiesis and Myelopoiesis in Lethally Irradiated Baboons. *Blood* 80,693-1701,1992.
3. **Barnett D., Janossy G., Lubenko A., Matutes A., Newland, Reilly J. T.**: Guideline for the flow enumeration of CD34+ haematopoietic stem cells 21, 301-308, 1999.
4. **Berenson R. J., Andrews R. G., Besinger W.J.**: Antigen CD34+ marrow cells engraft lethally irradiated baboons. *Journal of Clinical Investigation* 81, 951-955,1988.
5. **BRASIL.** Ministério da Saúde. Portaria n. 1.217, de 13 de outubro de 1999.
6. **Elliott C., Samson D. M., Armitage S., et al.**: When to Harvest Peripheral – Blood Stem Cells After Mobilization Therapy: Prediction of CD34-Positive Cell Yield by Preceding Day CD34-Positive Concentration in Peripheral Blood. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 14, 3:970-973, 1996.
7. **Gratama J. W., Keeney M., Sutherland D. R., et al.**: Enumeration of CD34+ Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. *Current Protocols in Cytometry* 6.4.1-6.4.22, 1999.
8. **Gratama J. W., Orfao A., Barnett D. et al.**: Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cytometry (Communication in Clinical Cytometry)* 34:128-142, 1998.
9. **Nakamura Y., Ando K., Muguruma Y., et al.**: Enrichment of lineage CD34 cells using a newly developed filter system. *British Journal of Haematology*, 108: 801-804, 2000.
10. **Osma M. M., Ortuño F., Arriba F., et al.**: Parámetros predictivos de la movilización en el trasplante autogênico de progenitores hematopoyéticos circulantes. *SANGRE, Trabajos de Hematología y Hemoterapia*, Vol. 44, 1:15,1999.
11. **Ross A. A., Miller G. M., Moss T. J., et al.**: Immunocytochemical detection of tumors cells in bone marrow and peripheral blood stem cell collections from patients with ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant*, 15, 929-933, 1995.
12. **Ward T., Grenier K., Knape C., et al.**: ProCOUNT, Setting the Standard for Progenitor Cell Enumeration.1997.

Endereço para correspondência
 Profª Patrícia Haas
 ACL/CCS/UFSC
 Florianópolis-SC - 88040-900
 E-mail: haas@ccs.ufsc.br

Parâmetros hemostáticos na gravidez normal e após o parto

Hemostatic parameters in normal pregnancy and postpartum

Luci Maria Sant'Ana Dusse, PhD¹; Lauro Mello Vieira, PhD¹ & Maria das Graças Carvalho, PhD²

RESUMO – Relatos da literatura revelam que a gravidez normal está associada a complexas alterações da hemostasia que resultam em um estado de hipercoagulabilidade sanguínea. O objetivo do presente estudo foi estabelecer a evolução de 8 marcadores que refletem diversas etapas do processo hemostático, avaliados ao final da gravidez e 4 meses após o parto. A condição hemostática de 8 gestantes, que não tiveram complicações durante a gravidez e não apresentavam doenças intercorrentes, no 3º trimestre de gestação (Grupo I) e 4 meses após o parto (Grupo II) foi avaliada através da determinação dos níveis plasmáticos de trombomodulina (TM), ativador tissular do plasminogênio (t-PA), inibidor do ativador do plasminogênio (PAI), fragmento 1 + 2 da protrombina (F_{1+2}), plasminogênio (Plg), fibrinogênio, Dímero D (D-Di) e da contagem de plaquetas. A análise dos resultados mostrou uma diferença significativa entre as médias obtidas nos dois grupos para TM ($p < 0.05$), t-PA ($p < 0.01$), PAI-1 ($p < 0.05$), fibrinogênio ($p < 0.01$), F_{1+2} ($p < 0.001$) e D-Di ($p < 0.001$). Para plasminogênio e contagem de plaquetas nenhuma diferença foi observada. Estes resultados permitem concluir que a gravidez normal está associada a uma exacerbação do mecanismo da coagulação e que o sistema fibrinolítico está funcionando adequadamente, o que previne a formação de trombos. Quatro meses após o parto, nenhuma alteração nos parâmetros hemostáticos avaliados foi observada, caracterizando o retorno à condição hemostática normal.

PALAVRAS-CHAVE – Parâmetros hemostáticos, gravidez, pós-parto.

SUMMARY – Previous investigations reveal that normal pregnancy is associated to complex alterations of the hemostasia leading to a blood hypercoagulability state. The aim of this study was to determine the hemostatic profile by using 8 clot markers which assess different stages of the hemostatic mechanism, measured at the end of the pregnancy and 4 months postpartum. Plasma measurements of thrombomodulin (TM), tissular-plasminogen activator (t-PA), plasminogen activator inhibitor (PAI), prothrombin fragment 1+2 (F_{1+2}), plasminogen (Plg), fibrinogen, D-Dimer (D-Di) and platelets count were obtained for 8 healthy pregnant women who show neither complication during pregnancy nor intercurrent diseases at the 3rd trimester of pregnancy (Group I) and 4 months postpartum (Group II). The analysis of the results showed a significant difference between the two groups for TM ($P < 0.05$), t-PA ($P < 0.01$), PAI-1 ($P < 0.05$), fibrinogen ($P < 0.01$), F_{1+2} ($P < 0.001$) and D-Di ($P < 0.001$), while plasminogen plasma levels and platelets count showed no difference. In conclusion, the results obtained in this study demonstrated that normal pregnancy is associated to an exacerbation of the coagulation mechanism. However, the fibrinolytic system seems to work properly, which may prevent thrombotic events. No change related to the assessed haemostatic parameters was observed 4 months postpartum, characterising the return to the normal hemostatic condition.

KEYWORDS – Hemostatic parameters, pregnancy, postpartum.

INTRODUÇÃO

O processo hemostático depende da interação delicada e complexa entre o endotélio vascular, as plaquetas, os fatores da coagulação, o sistema fibrinolítico, os inibidores da coagulação e a reparação vascular. Há um íntimo entrosamento de ação entre esses integrantes e a alteração da função de um deles pode levar a resultados hemostáticos inadequados¹⁰.

Relatos da literatura revelam que a gravidez normal está associada às complexas alterações da hemostasia que resultam em um estado de hipercoagulabilidade sanguínea^{4,9,12}. Considerando-se que o fluxo placentário em um embrião de sete semanas é de cerca de 50mL/minuto e em um feto a termo é de 800-1000mL/minuto e considerando-se, ainda, que esse aporte sanguíneo é bruscamente interrompido no mo-

mento do parto, é razoável admitir que as modificações do sistema hemostático que ocorrem ao longo da gravidez visem uma ação eficaz na zona de inserção placentária no momento do parto, de modo a prevenir uma hemorragia excessiva⁹. A hipercoagulabilidade fisiológica da gravidez pode resultar em processos patológicos e uma predisposição à trombose venosa tem sido observada¹⁸.

Embora um grande número de estudos do mecanismo hemostático na gravidez tem sido realizado, a maioria destes visa estabelecer as alterações hemostáticas em circunstâncias anormais (como na doença hipertensiva específica da gravidez (DHEG) e na diabetes) e as gestantes normais são incluídas como controle. De modo geral, especialmente no nosso meio, apenas um limitado número de parâmetros hemostáticos tem sido avaliado e detalhes importantes na avaliação laboratorial da hemostasia, como coleta e estocagem do plas-

Recebido em 24/3/2003

Aprovado em 11/8/2003

¹ Professores da Faculdade de Farmácia / Universidade Federal de Minas Gerais

ma e procedimentos laboratoriais utilizados, frequentemente estão ausentes nas publicações ou são inadequados. Além disso, nem sempre são claros os critérios de composição dos grupos de gestantes avaliados. Sabendo-se que a hemostasia sofre alterações ao longo da gestação, torna-se imprescindível determinar a idade gestacional exata, bem como excluir outras condições associadas à gravidez, que possam resultar em alterações hemostáticas. Esses detalhes são imprescindíveis para a comparação posterior dos resultados obtidos e estabelecimento das conclusões.

Numa revisão da literatura, verifica-se que a avaliação da hemostasia após o parto é raramente descrita. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi estabelecer a evolução de oito marcadores laboratoriais recentemente propostos, que refletem diversas etapas do processo hemostático, avaliados ao final da gravidez e quatro meses após o parto.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética da Maternidade Odete Valadares, Belo Horizonte - Minas Gerais, onde as gestantes foram selecionadas. O consentimento livre e esclarecido foi obtido em todos os casos.

Neste estudo foram avaliadas oito gestantes, que não tiveram complicações durante a gravidez e não apresentavam doenças intercorrentes, no terceiro trimestre de gestação (Grupo I) e quatro meses após o parto (Grupo II). A média de idade (anos) das participantes era $23,08 \pm 4,59$ e de idade gestacional (semanas), avaliada por ultra-sonografia, era $37,19 \pm 3,10$.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos do sistema *vacutainer* (Becton Dickinson), sendo 5mL em citrato de sódio e 3mL em EDTA. O sangue citratado foi rapidamente transferido para tubos plásticos, mantidos em gelo e encaminhados ao laboratório, onde foram centrifugadas por 10 minutos à 3000rpm, à temperatura ambiente. O plasma citratado foi dividido em alíquotas de $200\mu\text{L}$, utilizando tubos Eppendorf, que foram convenientemente vedados e mantidos à aproximadamente -20°C até o momento da realização dos testes laboratoriais (TM, t-PA, F₁₊₂, PAI-1, plasminogênio e D-Di). O fibrinogênio foi determinado em duplicata, no mesmo dia da coleta, por método colorimétrico (Goodwin mod.). As determinações de TM, t-PA, PAI-1 e D-Di foram feitas por Elisa, em duplicata, utilizando-se conjuntos diagnósticos da Stago Diagnostica. O F₁₊₂ foi determinado por Elisa utilizando o conjunto diagnóstico da Behring Diagnostica. A determinação do plasminogênio foi feita por ensaio cromogênico, em duplicata, utilizando o conjunto diagnóstico da Helena Laboratories. As instruções dos fabricantes foram rigorosamente seguidas.

RESULTADOS

As médias dos valores dos parâmetros hemostáticos obtidos ao final da gravidez e quatro meses após o parto estão sumarizadas na Tabela I.

A análise dos resultados mostrou uma diferença significativa entre as médias obtidas nos dois grupos para TM ($p < 0.05$), t-PA ($p < 0.01$), PAI-1 ($p < 0.05$),

TABELA I
Valores médios dos parâmetros hemostáticos ao final da gravidez e 4 meses após o parto

	3º trimestre de gravidez (Grupo I) (n=8) ¹	4 meses após o parto (Grupo II) (n=8) ¹
TM(ng/mL)	8.1 ± 4.2	3.9 ± 2.3*
t-PA(ng/mL)	12.3 ± 7.1	1.7 ± 0.8**
PAI-1(ng/mL)	114.6 ± 48.3	44.8 ± 19.9*
Plasminogênio(%)	164.8 ± 39.1	132.4 ± 23.9
Plaquetas($\times 10^9/\text{mm}^3$)	269.8 ± 48.4	248.6 ± 59.2
Fibrinogênio(mg/dL)	511.3 ± 110.1	303.4 ± 57.2**
F ₁₊₂ (nmol/L)	2.9 ± 1.0	0.8 ± 0.4***
D-Di(ng/mL)	1244.0 ± 313.4	170.0 ± 79.9***

¹Média ρ D. P. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

TTM= trombotomodulina, t-PA= ativador tissular do plasminogênio, PAI-1= inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1, F₁₊₂= fragmento 1+2 da protrombina, D-Di= Dímero D.

fibrinogênio ($p < 0.01$), F₁₊₂ ($p < 0.001$) e D-Di ($p < 0.001$). Para plasminogênio e contagem de plaquetas nenhuma diferença foi observada.

DISCUSSÃO

A comparação entre as médias dos resultados dos parâmetros hemostáticos obtidos ao final da gravidez e quatro meses após o parto, mostrou que os níveis de TM ao final da gravidez foram cerca de duas vezes mais elevados que aqueles obtidos quatro meses após o parto (Tabela I). A TM é uma glicoproteína integrante da membrana celular, presente nos trofoblastos e nas células endoteliais de todo o território vascular, exceto no cérebro²². Essa proteína tem uma função importante no mecanismo hemostático, uma vez que é capaz de alterar a função da trombina, que deixa de ser um agente procoagulante e passa a atuar como anticoagulante, através da ativação da proteína C e conseqüente inibição dos fatores Va e VIIIa da coagulação⁵. O aumento da TM plasmática ao final da gravidez pode ser explicado pelas prováveis lesões da microvasculatura que ocorrem em conseqüência à grande distensão uterina. Os resultados obtidos quatro meses após o parto (3.9 ± 2.3) foram similares aos obtidos para indivíduos normais no mesmo laboratório (3.0 ± 1.5) e relatados na literatura^{14,16}.

Condizente com os resultados obtidos para TM, os níveis de t-PA, que também tem origem endotelial, mostraram-se cerca de seis vezes mais elevados ao final da gravidez, comparando-se com os valores obtidos quatro meses após o parto, embora ainda estivessem dentro da faixa de referência fornecida pelo fabricante (1 a 12ng/mL). Resultados contraditórios de t-PA têm sido encontrados na literatura, onde tanto um aumento como uma diminuição desse tem sido relatada³.

Os marcadores da cascata da coagulação, F₁₊₂ e fibrinogênio, mostraram-se elevados ao final da gestação ($p < 0.001$ e $p < 0.01$, respectivamente), sugerindo uma exacerbação da coagulação. O F₁₊₂ consiste em um fragmento inativo liberado quando a protrombina é clivada para formar a trombina e reflete, portanto, a geração de trombina *in vivo*²³. Quatro meses após o parto, os níveis de F₁₊₂ retornaram para a faixa de normalidade fornecida pelo fabricante (0.4-1.1nmol/L).

Em concordância com os resultados obtidos para fibrinogênio neste estudo, um aumento gradativo dos níveis plasmáticos de fibrinogênio ao longo da gravidez foi anteriormente descrito²¹. Quatro meses após o parto, os níveis de fibrinogênio também retornaram para a faixa de normalidade (200 a 400mg/dL).

Níveis plasmáticos de dímeros D têm sido interpretados não somente como um marcador de exacerbação do sistema da coagulação mas, também como um marcador do sistema fibrinolítico, sabendo-se que o dímero D constitui o menor produto de degradação da fibrina⁽⁸⁾. Em circunstâncias normais, este fragmento é rapidamente eliminado pelas células do sistema fagocítico mononuclear¹⁷. Assim, o aumento plasmático de D-Di ao final da gravidez está em concordância com o aumento de F₁₊₂ e de fibrinogênio, sugerindo uma exacerbação da coagulação sanguínea.

Os marcadores do sistema fibrinolítico, t-PA e PAI-1 mostraram-se elevados ao final da gravidez (p<0.01 e p<0.05, respectivamente), comparando-se com os valores obtidos 4 meses após o parto, embora os valores de t-PA ao final da gravidez, em sua maioria, não tenham sido maiores que o limite superior da faixa de normalidade definida pelo fabricante (12 ng/mL). Considerando-se que não houve diferença entre os níveis de plasminogênio, nos dois grupos, é possível inferir que existia, ao final da gravidez, um antagonismo de ações de inibidores e de ativadores do plasminogênio, o que justificaria os níveis inalterados de plasminogênio a despeito dos níveis elevados de PAI-1. Além do t-PA, o ativador do plasminogênio tipo uroquinase (u-PA) tem grande importância¹⁰. A literatura descreve um aumento de u-PA durante a gravidez, uma vez que a placenta produz este ativador²⁰. Assim, é possível que o u-PA tenha agido no sentido de neutralizar o excesso de PAI-1 e, dessa forma, manter os níveis de plasminogênio inalterados ao final da gravidez. Em concordância com os resultados obtidos neste estudo, Ballergeer *et al.*, 1987², investigaram a resposta à oclusão venosa em gestantes e concluíram que a atividade fibrinolítica não estava alterada na gravidez, apesar da alteração dos níveis plasmáticos de inibidores e ativadores do plasminogênio. Há um consenso na literatura com relação ao aumento gradativo de inibidores do plasminogênio (PAI-1 e PAI-2) ao longo da gravidez^{1,6,12,15,20,21} e um papel desses inibidores, no sentido de proteger a integridade da vascularização placentária tem sido proposto⁷.

O número de plaquetas circulantes não diferiu entre os dois grupos. Investigações anteriores sugerem um aumento da ativação plaquetária durante a gravidez, o que contribui para o estado de hipercoagulabilidade^{11,13}. No entanto, no presente estudo não foi avaliado se as plaquetas estavam ativadas.

Concluindo, os resultados obtidos neste estudo demonstram que a gravidez normal está associada a uma exacerbação do mecanismo da coagulação e que o sistema fibrinolítico está funcionando adequadamente, o que previne a formação de trombos. Evidências de lesão vascular foram obtidas e é provável que a exposição do subendotélio vascular esteja contribuindo para desencadear a ativação do sistema da coagulação. Quatro meses após o parto, nenhuma alteração nos parâmetros hemostáticos avaliados foi observada, caracterizando o retorno à condição hemostática normal.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais/FAPEMIG, à Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG, às equipes de Ginecologia/Obstetrícia e de Enfermagem da Maternidade Odete Valadares, em Belo Horizonte-MG, de modo especial, ao Dr. Antônio Fernandes Lages.

REFERÊNCIAS

1. Adler, G., Duchinski, T., Jasinska, A., Piotrowska, U. Fibrinogen fractions in the third trimester of pregnancy and in puerperium. *Thromb. Res.*, 2000; 97: 405-10.
2. Ballergeer, V., Mombaerts, P., Declerck, P. J., Spitz, B., Van Assche, F. A., Collen, D. Fibrinolytic response to venous occlusion and fibrin fragment D-Dimer levels in normal and complicated pregnancy. *Thromb. Haemostasis*, 1987; 58: 1030-1032.
3. Bellart, J., Gilabert, R., Fontcuberta, J., Borrell, M., Mirales, R. M., Cabero, L. Fibrinolysis changes in normal pregnancy. *J. Perinat. Med.*, 1997; 25: 368-372.
4. Bonnar, J., Mcnicol, G. P., Douglas, A. S. Coagulation and fibrinolytic mechanisms during and after normal childbirth. *Br. Med. J.*, 1970; 2: 12-16.
5. Esmon, C. T. The regulation of natural anticoagulant pathways. *Science*, 1987; 235: 1348-1352.
6. Estellés, A., Gilabert, J., Grancha, S., Yamamoto, K., Thinnis, T., España, F., Aznar, J., Loskutoff, D. Abnormal expression of type 1 plasminogen activator inhibitor and tissue factor in severe preeclampsia. *Thromb. Haemostasis*, 1998; 79: 500-508.
7. Fletcher, A. P., Alkjaersig, N. K., Burstein, R. The influence of pregnancy upon blood coagulation and plasma fibrinolytic enzyme function. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1979; 134: 743-751.
8. Gaffney, P. J., Joe, F., Mahmoud, M. Giant fibrin fragments derived from crosslinked fibrin: structure and clinical implication. *Thromb. Res.*, 1980; 20: 647-662.
9. Gilabert, J., Estellés, A., España, F., Grancha, S., Aznar, J. Modifications of the hemostasia en obstetricia. *Rev. Iberoamer. Tromb. Hemostasia*, 1995; 8:102-112.
10. Handin, R. I., Lux, S.E., Stossel, T. P. *The Hemostatic System, Blood: principles, practice of hematology*. J. B. Lippincott, Philadelphia, 1995. p. 949, 957.
11. Hardy, E., Rubin, P. C., Horn, E. H. Effects of nitric oxide donors *in vitro* on the arachidonic acid-induced platelet release reaction and platelet cyclic GMP concentration in pre-eclampsia. *Clin. Sci.*, 1994; 85: 195-202.
12. Higgins, J. R., Walshe, J. J., Darling, M. R. N., Norris, L., Bonnar, J. Haemostasis in the uteroplacental and peripheral circulations in normotensive and pre-eclamptic pregnancies. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 1998; 179: 520-526.
13. Horn, E. H., Cooper, J., Hardy, E., Heptinstasll, S., Rubin, P. C. A cross-sectional study of platelet cyclic AMP in healthy and hypertensive pregnant women. *Clin. Sci.*; 80: 549-58.
14. Minakami, H., Takahashi, T., Izumi, A., Tamada, T. Increased levels of plasma thrombomodulin in preeclampsia. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1993; 36: 208-210.
15. Nakashima, A., Kobayashi, T., Terao, T. Fibrinolysis during Normal Pregnancy and Severe Preeclampsia Relationships between Plasma Levels of Plasminogen Activators and Inhibitors. *Gynecol. Obstet. Invest.*, 1996; 42: 95-101.
16. Ohlin, A. K., Morser, J., Ohlin, H. Soluble thrombomodulin antigen in plasma is increased in patients with acute myocardial infarction treated with thrombolytic therapy. *Thromb. Res.*, 1996; 82 (4): 313-322.
17. Ott, P., Astrup, L., Jensen, R. H., Nyeland, B., Pedersen, B. Assessment of D-Dimer in Plasma: Diagnostic Value in Suspected Deep Venous Thrombosis of the Leg. *Acta Med. Scand.*, 1988; 224: 263-267.
18. Poller, L. & Thompson, J. M. Thrombosis and its management. London: Churchill Livingstone. 1993.
19. Scazzioti, A., Altman, R. El mecanismo de la hemostasia normal. *Rev. Iberoamer. Tromb. Hemostasia*, 1996; 1: 9-26.
20. Shimada, H., Takashima, E., Soma, M., Murakami, M., Maeda, Y., Kasakura, S., Takada, A., Takada, Y. Source of increased plasminogen activators during pregnancy and puerperium. *Thromb. Res.*, 1989; 54: 91-98.
21. Stirling, Y. Woolf, L., North, W. R. S., Seghatchian, M. J., Meade, T. W. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb. Haemostas*, 1984; 52: 176-182.
22. Walker, F. F., Fay, P. J. Regulation of blood coagulation by the protein C system. *FASEB J.*, 1992; 6: 2561-2567.
23. Yamazaki, M., Asakura, H., Saito, M., Jokaji, H., Uotani, C., Kumabashiri, I., Morishita, E., Aoshima, K., Matsuda, T., Triplett, D. A. Prothrombin fragment 1 + 2 measures treatment effect in patients with antiphospholipid syndrome. *Thromb. Res.*, 1998; 91: 121-128.

Endereço para correspondência

Luci Maria Sant'Ana Dusse

Av. Olegário Maciel, 2360/608 Lourdes - Belo Horizonte, MG- 30180-112

E-mail: lucim@farmacia.ufmg.br

Cistatina C: um novo marcador para filtração glomerular comparada ao *clearance* de creatinina e a creatinina sérica*

Cystatin C: a new marker for glomerular filtration rate compared to creatinine clearance and serum creatinine

Toni Ricardo Martins¹; Cyntia M. T. Fadel-Picheth²; Vânia M. Alcântara²; Marileia Scartezini² & Geraldo Picheth²

RESUMO – A Cistatina C é uma proteína de baixo peso molecular (~ 13 kDa) produzida constantemente em todas as células nucleadas. Esta molécula é livremente filtrada no glomérulo renal, reabsorvida e catabolizada no túbulo proximal, sendo os níveis séricos dependentes e indicadores da função de filtração glomerular. Esta revisão aborda o desempenho da Cistatina C em relação aos testes usualmente empregados na rotina laboratorial para a avaliação da função renal. Verifica-se que a Cistatina C é um marcador confiável da filtração glomerular mais sensível e específico que as determinações de creatinina sérica e *clearance* de creatinina, e pode ser uma alternativa atrativa, especialmente quando a população pediátrica é considerada.

PALAVRAS-CHAVE – Cistatina C, creatinina, *clearance* de creatinina, doença renal, índice de filtração glomerular.

SUMMARY – Cystatin C is a low molecular weight protein (~ 13 kDa) produced in a constant rate in all nucleated cells. This molecule is freely filtered in the renal glomeruli, reabsorbed and catabolised in the proximal tubules. Serum levels of Cystatin C were used as marker for glomerular filtration rate and acclaimed to be more sensitivity and specificity than serum creatinine and creatinine clearance. We investigated the literature about Cystatin C and its performance compared to usual routine laboratory kidney function tests. We concluded that Cystatin C is a reliable marker for glomerular filtration rate, and could be a very attractive alternative to creatinine and creatinine clearance, particularly when the pediatric population are concerned.

KEYWORDS – Cystatin C, serum creatinine, creatinine clearance, renal disease, glomerular filtration rate.

INTRODUÇÃO

A função renal é essencial para manutenção da homeostasia do organismo, eliminando produtos de excreção do metabolismo, mantendo a composição química constante do sangue e dos líquidos intracelular e intersticial, através dos mecanismos de reabsorção e secreção, que caracterizam os rins como órgãos excretadores e também reguladores (Henry, 1995; Strasinger, 1996).

A deficiência da função renal está fortemente relacionada com a morbidade e a mortalidade. O laboratório fornece informações essenciais para a caracterização das enfermidades renais, através de investigações bioquímicas rotineiras e especializadas, sendo um importante aliado do clínico no campo da nefrologia (Burtis e Ashwood, 1999).

A função renal geralmente é avaliada através da quantificação de um marcador glomerular, que deve ser eliminado ou clareado do organismo através do mecanismo de filtração glomerular (Hagstam *et al.*, 1974). Na rotina laboratorial, as determinações de uréia, creatinina sérica e *clearance* de creatinina, são empregadas como os principais marcadores da função renal.

A uréia foi a primeira substância endógena utilizada para avaliar a função renal, que teve a sua concentração determinada no soro. É o principal produto nitrogenado do catabolismo protéico nos seres humanos, res-

ponsável por mais de 75% do nitrogênio não-protéico excretado. A uréia, uma molécula pequena e sem carga, é livremente filtrada pelos glomérulos sendo que uma grande fração desta (40–50%) é passivamente reabsorvida nos túbulos renais não ocorrendo secreção tubular apreciável (Marshall e Bangert, 1995). O intenso processamento tubular da uréia pode levar este marcador da função renal a subestimar a capacidade de filtração glomerular. A concentração sérica de uréia é influenciada também pela dieta (ingesta protéica), função hepática (local de síntese da uréia) e numerosos estados patológicos de origem não renal, fatores que afetam sua especificidade como marcador da função renal (Burtis e Ashwood, 1999).

Nas últimas quatro décadas a creatinina sérica tem sido utilizada como marcador de preferência para avaliar a função renal. A creatinina é um produto metabólico da creatina presente no tecido muscular, e a sua concentração sérica é afetada pela idade, sexo e massa muscular (Heymsfield *et al.*, 1983; James *et al.*, 1988). A creatinina sérica é livremente filtrada pelos glomérulos, não é reabsorvida no túbulo proximal, porém é secretada em pequena quantidade no mesmo. É um bom marcador da função renal em pacientes com redução na capacidade de filtração glomerular moderada a severa (<50mL/min), no entanto, é pouco sensível na detecção de pequenos decréscimos na filtração glome-

Recebido em 9/4/2003

Aprovado em 21/8/2003

*Trabalho realizado no Curso de Pós-Graduação em Análises Clínicas com ênfase na interdisciplinaridade - PUC-PR

¹Farmacêutico-Bioquímico do Laboratório Bioanálises de Itajaí – SC; ²Professores do Depto Patologia Médica – Curso de Farmácia - UFPR

ricular, devido à relação não linear entre a concentração sérica e capacidade de filtração glomerular (Levey *et al.*, 1989).

Os ensaios de *clearance* ou depuração estimam teoricamente a quantidade de plasma ou sangue (mL), que é completamente clareado (limpo) de uma dada substância em um tempo (minutos) determinado (Walmsley e White, 1994).

Várias substâncias exógenas podem ser utilizadas para estimar a filtração glomerular nos ensaios de *clearance* como a inulina, o ^{51}Cr -EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético ligado ao cromo), o $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (dietilenotriaminopenta-acetato ligado ao Tecnécio), o ^{125}I -iodotalamato, o iohexol, substâncias que embora apresentem vantagens na avaliação da função renal, são ensaios especializados e pouco utilizados na rotina (Shemesh *et al.*, 1985; Rehling e Rabol, 1989; Goates *et al.*, 1990). Os *clearances* de inulina, considerado como *gold standard* (Plebani *et al.*, 1998) e de ^{51}Cr -EDTA, são marcadores da filtração glomerular que apresentam características farmacocinéticas próximas às ideais, porém diversas considerações práticas têm restringido a sua aplicação clínica. A administração endovenosa destes produtos, a realização dos ensaios, que requerem reagentes e/ou equipamentos complexos, e os custos elevados justificam a baixa aplicabilidade destas determinações. Outro ensaio promissor, o *clearance* com iohexol, introduzido há uma década como uma técnica simples e flexível de monitoramento da filtração glomerular, requer o uso de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) na detecção do iohexol, o que tem limitado a sua utilização (Krutzen *et al.*, 1984).

O emprego na rotina laboratorial do cálculo do *clearance* da creatinina endógena, obtido com as determinações da creatinina no soro e urina, associado ao fluxo urinário, permite uma boa estimativa da capacidade de filtração glomerular com determinações simples e de baixo custo, mas sujeita a vários interferentes (Perrone *et al.*, 1992).

Na busca de um marcador de filtração renal mais adequado, diferentes proteínas de baixo peso molecular, que poderiam oferecer uma correlação fiel e acurada com a filtração glomerular foram analisadas. Dentre essas, a Cistatina C foi reconhecida como um bom marcador endógeno da filtração glomerular, sendo a sua utilidade bem documentada (Grubb *et al.*, 1985; Dati, 1998; Cruz *et al.*, 1999).

Discutimos neste trabalho as características da Cistatina C como marcador da função glomerular e sua performance comparada a ensaios de rotina como a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina, bem como com outros marcadores de referência da função renal.

Cistatina C

Butler e Flynn (1961) descreveram em pacientes com proteinúria, a presença na urina de uma proteína denominada *post-gama*, ou *post-gama globulina*. A presença da mesma proteína no plasma, urina, líquido cefalorraquiano, líquidos ascítico e pleural, foi demonstrada por Hochwald e Thorbecke (1962) que a denominaram *g-trace*, sendo que foi posteriormente designada como Cistatina C (Dati, 1998; Mussap *et al.*, 1998).

A Cistatina C é uma proteína pertencente à superfamília das proteínas inibidoras de cisteínas proteínicas, também denominadas de superfamília das cistati-

nas. A Cistatina C é constituída de 120 aminoácidos e apresenta baixo peso molecular (~13 kDa). É uma proteína básica, não glicada que apresenta duas pontes de enxofre. Esta proteína apresenta carga positiva no pH fisiológico e ponto isoelétrico de 9,3 (Hochwald *et al.*, 1962; Mussap *et al.*, 1998; Laterza *et al.*, 2002).

O gene da Cistatina C humana está localizado no cromossomo 20p11.2, segundo Grubb e Lofberg (1982). Finckh *et al.* (2000) descreveram uma associação entre o haplótipo B, em homozigose do gene da Cistatina C (GST3 B/B), com a doença de Alzheimer de aparecimento tardio. Outros autores também descrevem uma relação entre o polimorfismo do gene da Cistatina C com a doença de Alzheimer (Crawford *et al.*, 2000; Deng *et al.*, 2001). No entanto, Maruyama *et al.* (2001) estudando uma população japonesa não confirmaram esta associação. Novos estudos serão necessários para substanciar estes achados e propiciar hipóteses consistentes que expliquem a relação entre o gene da Cistatina C e a doença de Alzheimer.

Uso diagnóstico da Cistatina C como marcador da função renal

Embora o uso da Cistatina C como um novo marcador para a função renal tenha sido sugerido desde 1985, só recentemente o seu uso na rotina laboratorial tem sido avaliado de forma sistemática (Randers e Erlandsen, 1999).

Os principais atributos da Cistatina C, como marcador bioquímico para avaliar a função renal de filtração glomerular, são o pequeno tamanho e alto ponto isoelétrico os quais permitem que esta proteína seja facilmente filtrada através da membrana glomerular, sendo reabsorvida no túbulo proximal em uma proporção significativa e, então, catabolizada de forma quase total neste sítio (Plebani *et al.*, 1998; Cruz *et al.*, 1999). Não estão descritas rotas extra-renais de eliminação da Cistatina C, e fatores como processos inflamatórios e infecciosos não alteram os níveis desta proteína, que são essencialmente dependentes da filtração glomerular. (Burtis e Ashwood, 1999). No entanto, a elevação dos níveis de Cistatina C durante a evolução de doenças malignas, na ausência de alterações da função renal, foi observada, sugerindo que o aumento da síntese desta proteína seja induzida por estes processos patológicos (Newman, 1999). Entretanto, não se observou alteração nos níveis séricos de Cistatina C em pacientes com doenças proliferativas de origem hematológica, quando os níveis desta proteína foram comparadas aos marcadores beta-2-microglobulina e a razão beta-2-microglobulina/Cistatina C (Mojiminiyi *et al.* 2002).

Os níveis séricos de Cistatina C não são afetados pela massa muscular e alteram-se muito pouco com a idade, nítidas vantagens quando comparada a creatinina (Finney *et al.*, 1997). A Figura 1 mostra de forma esquemática o processamento da Cistatina C no néfron.

Cistatina C, creatinina sérica e *clearance* de creatinina

As determinações da creatinina sérica e do *clearance* de creatinina em urina de 24 horas são os procedimentos mais utilizados para a avaliação da função de filtração glomerular na rotina laboratorial, porém, apresentam alguns inconvenientes. Variáveis pré-analíticas como a perda de urina durante a coleta e hidratação inadequada do paciente, bem como interferência analítica método-dependente decorrente da presença de bi-

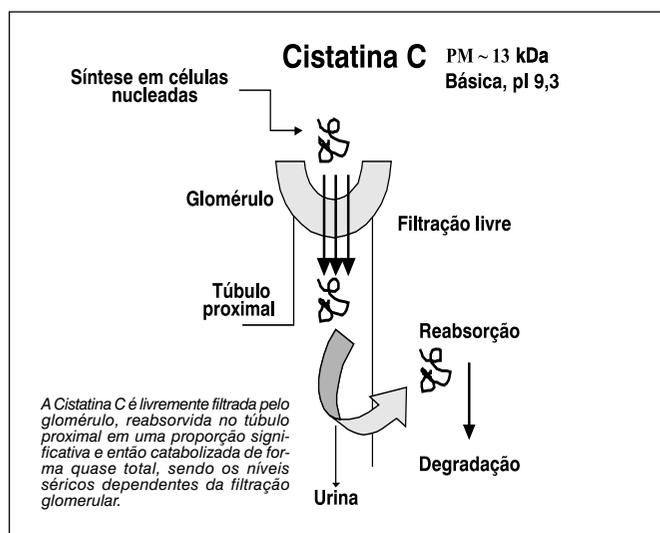


FIG.1 - Processamento da Cistatina C no néfron.

lirrubina, glicose, ascorbato e hemólise em níveis apreciáveis, ou substâncias exógenas como as ciclosporinas e cefalosporinas e outros medicamentos e seus metabólitos, acabam limitando a utilidade desses marcadores (Plebani *et al.*, 1998). Nas situações em que a função renal está discretamente alterada, a correlação entre a creatinina sérica e a filtração glomerular é menor, levando a uma estimativa imprecisa da filtração glomerular devido à alta variabilidade interindividual (Schemesh *et al.*, 1985). Foi sugerido que a determinação de Cistatina C possa substituir as dosagens séricas de creatinina nos estudos de avaliação da função glomerular (Newman *et al.*, 1995).

A Tabela I resume as principais vantagens da Cistatina C em relação à determinação do *clearance* de creatinina (Plebani *et al.*, 1998; Finney *et al.*, 1997; Cruz *et al.*, 1999).

Vários estudos têm comparado os níveis séricos de Cistatina C com os marcadores utilizados de rotina, creatinina e *clearance* de creatinina. Segundo Stickle *et al.* (1998) que analisaram os resultados de uma população pediátrica, sumarizados na Tabela II, a quantificação da Cistatina C é equivalente à determinação da creatinina na avaliação da função glomerular.

Entretanto em um outro estudo realizado com uma população pediátrica ($6,9 \pm 2,8$ anos) e utilizando o *clearance* de inulina ($r=0,88$) como referência, foi reportado que a recíproca da concentração da Cistatina C sérica apresentou correlação melhor e significativa ($p < 0,01$) do que a recíproca da creatinina sérica ($r=0,72$). Utilizando um *cut off* para a Cistatina C de 1,39 mg/L, foram obtidos valores de 90% e 86%, respectivamente, para sensibilidade e especificidade (Bökenkamp *et al.* 1998). Estes autores concluíram que a Cistatina C parece ser uma alternativa promissora à determinação de creatinina como marcador da filtração glomerular, em particular pela concentração desta proteína ser independente de idade, sexo, peso, altura, fatores que afetam a utilidade da creatinina sérica, no que concordam Helin *et al.* (1998). Através de análise de regressão linear Bökenkamp *et al.* (1998) propuseram estimar a filtração glomerular com base na concentração sérica de Cistatina C, sendo a filtração glomerular (expressa em mL/min/1,73m²) estimada pelo cálculo $[163/Cistatina\ C\ (mg/L)] - 30$.

TABELA I
Vantagens da determinação sérica da Cistatina C em relação ao *clearance* de creatinina na avaliação da função glomerular

Variáveis	Cistatina C	<i>Clearance</i> de Creatinina
Massa muscular	Sem interferência	Depende da massa muscular
Idade	Sem variação apreciável	Varia significativamente
Sexo	Sem variação apreciável	Variável
Amostra	Apenas uma amostra de soro	Necessita soro e urina coletada em tempo determinado, usualmente 24 horas.
Alimentação	Sem interferência	Alimentação pode interferir
Fase analítica	Poucos interferentes	Vários interferentes

TABELA II
Cistatina C e creatinina sérica em população pediátrica

Faixa etária (anos)	Analito	Cut off	Sensibilidade	Especificidade	p	n
4 a 12	Cistatina C	1,2mg/L	0,80	0,91	0,29	26
	Creatinina	8,0mg/L	0,67	1,00		26
12 a 19	Cistatina C	1,4 mg/L	0,87	1,00	0,99	34
	Creatinina	9,0 mg/L	0,91	0,91		34

Segundo Stickle *et al.*, 1998.

Utilizando como referência o *clearance* com ⁵¹Cr-EDTA em 52 pacientes pediátricos, com idade entre 2 e 16 anos, dos quais, 19 apresentavam uma filtração glomerular < 90 mL/min a correlação encontrada para a Cistatina C foi de $r=0,89$ e $r=0,80$ para a creatinina sérica. A Cistatina C apresentou melhor desempenho do que a creatinina sérica, apresentando uma sensibilidade e especificidade de 100% e 97% respectivamente, para estimar a filtração glomerular, enquanto que para a creatinina sérica os valores de sensibilidade e especificidade foram 74% e 97% respectivamente (Ylinen *et al.* 1999).

A determinação de Cistatina C apresenta vantagens em relação a creatinina sérica e ao *clearance* de creatinina em populações pediátricas. Por estar relacionada com a massa muscular, a creatinina sérica pode não detectar pequenos aumentos na filtração glomerular em crianças menores de 4 anos que apresentem pequenas lesões renais, enquanto a Cistatina C parece ser bastante constante em crianças maiores de 1 ano de idade e adultos (Laterza *et al.*, 2002).

Uma correlação similar na avaliação da filtração glomerular entre a Cistatina C e a creatinina sérica foi reportada por Grubb *et al.* (1985), sendo o *clearance* com ⁵¹Cr-EDTA utilizado como referência. Os resultados encontrados foram $r=0,77$ e $0,75$ respectivamente para Cistatina C e creatinina sérica. Nesse estudo foram analisados 135 pacientes com idade entre 7 e 77 anos apresentando várias patologias renais, incluindo glomerulonefrite primária e secundária, desordens reumáticas e nefropatias diabéticas.

Em um estudo realizado com 27 pacientes-controle, saudáveis e 24 pacientes com redução na taxa de filtração glomerular (< 80 mL/min) Kyhse-Andersen *et al.* (1994), encontraram uma correlação significativamente maior ($p < 0,001$) para a concentração da Cistatina C com $r=0,87$ do que para a creatinina sérica com $r=0,71$, quando a função de filtração glomerular foi avaliada através do *clearance* de ioexol, sugerindo a impor-

tância da Cistatina C como um marcador endógeno na avaliação da taxa de filtração glomerular.

Kazama *et al.*, (2002) estudando 212 pacientes apresentando várias doenças renais concluem que a Cistatina C é um teste excelente para a detecção de disfunções renais subclínicas. Correlações de $r=0,91$ e $r=0,89$ respectivamente para Cistatina C e creatinina sérica foram encontradas em estudo realizado com 76 pacientes com diversas doenças renais quando a avaliação da função glomerular foi comparada ao *clearance* com ^{99m}Tc -DTPA (Randers *et al.* 1998).

A Cistatina C apresentou um desempenho superior às determinações de creatinina e ao *clearance* de creatinina na estimativa da filtração glomerular após transplante renal. Foi relatada uma forte correlação da Cistatina C com o *clearance* realizado com ^{51}Cr -EDTA e a ausência de resultados falso-positivos, enquanto a creatinina apresentou uma grosseira superestimativa da filtração glomerular com 25% de resultados falsos negativos (Le Bricon *et al.* 2000).

Trabalhando com a possibilidade de substituição da determinação da creatinina sérica pela Cistatina C para a estimativa da filtração glomerular, Stabuc *et al.* (2000) estudaram 72 pacientes com câncer, antes e depois das sessões de quimioterapia. Os resultados demonstraram a superioridade da Cistatina C em relação à creatinina sérica na avaliação da função renal, quando a filtração glomerular foi < 78 mL/min. O *clearance* com ^{51}Cr -EDTA foi utilizado como referência ($r=0,84$ vs $0,74$ respectivamente; $p=0,01$). Os resultados encontrados foram independentes da presença de metástases, e aqueles autores concluíram que a Cistatina C pode ser uma escolha melhor que a creatinina sérica para monitorar a função renal durante a quimioterapia.

Harmoinen *et al.* (1999), avaliaram a Cistatina C como marcador da filtração glomerular em pacientes com diabetes tipo 2, usando como referência o *clearance* de ^{51}Cr -EDTA. Observaram uma melhor correlação com a concentração da Cistatina C ($r=0,774$) frente ao *clearance* de ^{51}Cr -EDTA, do que a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina, respectivamente, $r=0,556$ e $r=0,411$. Concluem que a Cistatina C é mais sensível e específica do que a creatinina sérica e o *clearance* de creatinina na avaliação da taxa de filtração glomerular em pacientes com diabetes tipo 2, quando a filtração glomerular está normal ou ligeiramente reduzida.

A Cistatina C também mostrou ser um bom marcador na avaliação da função renal em pacientes que apresentavam artrite reumatóide por um período superior a 50 meses. Em 56 pacientes ($62,1 \pm 13,8$ anos) usuários de medicação com potencial nefrotóxico foram realizadas as determinações de Cistatina C, creatinina sérica e *clearance* de creatinina. Destes pacientes, 60% exibiram níveis elevados de Cistatina C, enquanto apenas 3 mostraram aumento nos níveis de creatinina sérica, sendo que o *clearance* de creatinina mostrou-se reduzido em 57% dos pacientes, evidenciando uma correlação superior da Cistatina C com o *clearance* de creatinina quando comparada a creatinina sérica. Desta forma, a Cistatina C pode ser um indicador precoce de doença renal incipiente, na artrite reumatóide (Mangge *et al.*, 2000).

Um estudo de meta-análise de 46 artigos publicados na literatura internacional até dezembro de 2001 permitiu a Dharnidharka *et al.* (2002) concluírem que a determinação de Cistatina C é superior a determina-

ção da creatinina sérica como marcador da função de filtração glomerular.

Em uma avaliação envolvendo pacientes que apresentaram a condição de pré-eclâmpsia (pressão sanguínea diastólica > 90 mmHg, excreção de albumina urinária $> 300\text{mg/L}$), Strevens *et al.* (2001) demonstraram vantagens no uso da Cistatina C quando comparada a creatinina e ao urato sérico. Cabe ressaltar que nestes pacientes todos os marcadores mostraram níveis séricos elevados, porém, a Cistatina C apresentou melhor desempenho (exatidão diagnóstica) na caracterização da pré-eclâmpsia do que os outros componentes sanguíneos. A Cistatina C também se mostrou um marcador confiável na avaliação da filtração glomerular em mulheres grávidas, não-grávidas, saudáveis ou hipertensas (Strevens *et al.*, 2002).

Estudos envolvendo pacientes com cirrose hepática e sua relação com a Cistatina C tem sido realizados. Pacientes com cirrose avançada e redução na filtração glomerular podem apresentar valores séricos normais de creatinina, devido ao decréscimo da massa muscular e aumento da secreção tubular de creatinina (Takahatake *et al.*, 1988; Caregaro *et al.*, 1994). Orlando *et al.* (2002) compararam a Cistatina C, creatinina sérica e *clearance* de creatinina diante do *clearance* de inulina para avaliar a filtração glomerular em 36 pacientes com cirrose hepática e 56 pacientes não-cirróticos, ambos os grupos continham pacientes com filtração glomerular normal e alterada. A Cistatina C apresentou maior sensibilidade diagnóstica no decréscimo da taxa de filtração glomerular, mostrando-se, portanto, superior aos marcadores laboratoriais utilizados de rotina. Randers *et al.* (2002) também relataram a melhor acurácia da Cistatina C quando comparada à creatinina sérica no diagnóstico de pacientes com cirrose hepática e filtração glomerular reduzida.

Também trabalhando com pacientes cirróticos, Woitas *et al.* (2000) encontraram vantagem significativa no uso da Cistatina C na detecção da alteração da filtração glomerular em relação a creatinina e ao *clearance* de creatinina. No entanto, observaram que nenhum dos marcadores citados permite a estimativa exata da filtração glomerular em cirróticos.

Comparando a creatinina sérica com o quociente albumina/creatinina e a Cistatina C na avaliação da função renal em pacientes com mais de 70 anos, Wasén *et al.* (2002) mostraram que a Cistatina C é um marcador confiável e um ensaio simples para triagem na detecção precoce da insuficiência renal em idosos.

Quando comparada com a creatinina e outros marcadores protéicos de baixo peso molecular na detecção de redução na filtração glomerular, em pacientes selecionados pelo *clearance* com ^{99m}Tc -DTPA, a Cistatina C apresentou boa performance. Os valores descritos por Jung e Jung (1995) estão mostrados na Tabela III.

A quantificação da β_2 -microglobulina sérica é utilizada para o diagnóstico e monitoramento de certas doenças infecciosas e malignas, em particular doenças linfoproliferativas como a mielomatose (Bethesda e Forman, 1990). Porém, a concentração da β_2 -microglobulina sérica sofre marcada influência da filtração renal do paciente. Como a Cistatina C sérica é influenciada apenas pela filtração renal, a razão entre as determinações séricas de β_2 -microglobulina/Cistatina C têm sido considerado um parâmetro mais específico para caracterizar a produção celular de β_2 -microglobulina do que a determina-

TABELA III
Comparação da Cistatina C com creatinina sérica e outros marcadores protéicos de baixo peso molecular na detecção da redução da filtração glomerular em pacientes (n= 31) selecionados pelo clearance com ^{99m}Tc-DTPA e cut off de 1,36 mL.s⁻¹ (Jung e Jung, 1995)

Parâmetro	Cut off (mg/L)	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Uso diagnóstico
Cistatina C	H=2,75 M=2,29	88,2	85,7	Filtração glomerular
α_1 -microglobulina	—	76,5	92,9	Reabsorção tubular
β_2 -microglobulina	2,75	64,7	100	Doenças infecciosas e malignas, doenças linfoproliferativas
Creatinina sérica	H=12,0 M=11,0	52,9	100	Filtração glomerular

H=homens; M=mulheres

ção desta proteína isolada. Foram propostos valores de referência de 1,45 a 2,43 para a relação β_2 -microglobulina/Cistatina C em adultos (Norlund *et al.*, 1997).

A Figura 2 representa as curvas de sensibilidade e especificidade diagnóstica para os ensaios de Cistatina C e creatinina séricas. Os resultados apresentados são representativos de várias referências encontradas na literatura.

A quantificação da Cistatina C

A Cistatina C é muito estável no soro, pode ser armazenado a 4°C ou congelado durante semanas ou meses sem perda apreciável na sua concentração. No líquido cefalorraquiano esta proteína pode ser degradada rapidamente, possivelmente pela ação das serinas proteases produzidas por microorganismos contaminantes ou liberação das enzimas de granulócitos durante o processo inflamatório (Abrahamson *et al.*, 1991). A dosagem em plasma heparinizado também é adequada, embora a turbidez decorrente de lipemia ou material particulado presente na amostra sejam fatores interferentes para os ensaios nefelométricos e turbidimétricos (Dade Behring, 1999).

Embora o uso diagnóstico para a Cistatina C tenha sido proposto há muitos anos, vários procedimentos utilizando como princípios de ensaio o ensaio imunoenzimático (EIA), o radioensaio (RIA), o fluoroensaio e a imunodifusão radial simples (RID) estão descritos, sem no entanto apresentarem uma padronização (Mussap *et al.*, 1998).

O primeiro ensaio para quantificar a Cistatina C, desenvolvido em 1979, foi um radioensaio (RIA) que tinha como limite de detecção 30 μ g/L, o que foi suficiente para detectar a Cistatina C no soro de indivíduos saudáveis. Posteriormente, novas técnicas foram desenvolvidas, apresentando como limite de detecção o intervalo de 0,13–1,9 μ g/L (Lofberg *et al.*, 1979; Laterza *et al.*, 2002).

Mais recentemente, métodos imunológicos baseados na turbidimetria e nefelometria, mais simples, acurados e rápidos, vêm ganhando espaço no laboratório clínico para quantificar a Cistatina C. As técnicas turbidimétricas e nefelométricas requerem pequenas quantidades de amostra, são métodos rápidos, precisos e apresentam a possibilidade de automação (Dati, 1998; Newman *et al.*, 1995; Kyhse-Andersen *et al.*, 1994). A Figura 3 mostra o princípio dos ensaios turbidimétricos ou nefelométricos utilizando partículas de látex ligadas a anticorpos contra a Cistatina C.

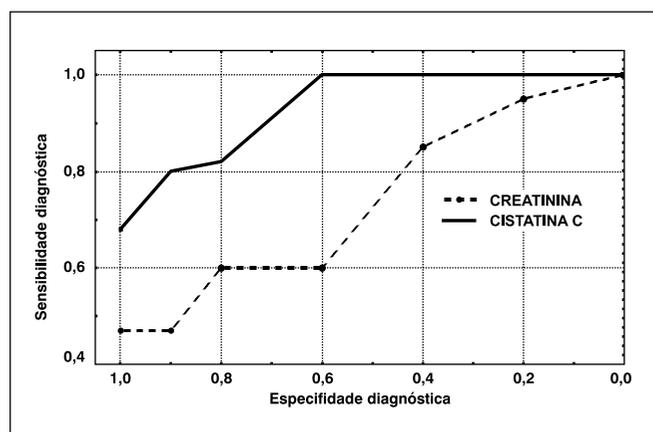


FIG. 2 - Sensibilidade e especificidade das determinações séricas de Cistatina C e creatinina (adaptado de Burtis e Ashwood, 1999).

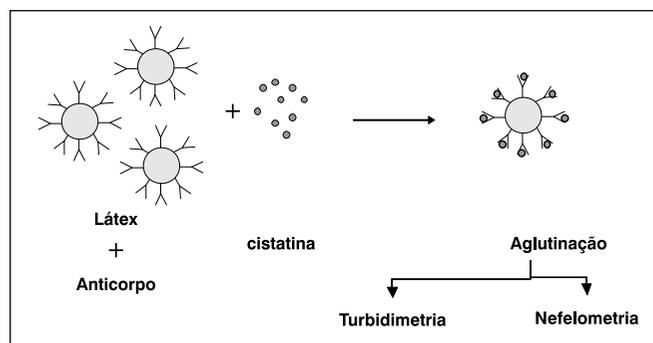


FIG. 3 - Princípio dos ensaios turbidimétricos ou nefelométricos para determinação da Cistatina C sérica.

A imprecisão analítica da determinação sérica da Cistatina C apresenta o coeficiente de variação entre 1,2 a 5,5% (interensaio) para concentrações de 5,28 e 0,97 mg/L, respectivamente no ensaio imunoturbidimétrico (Bökenkamp *et al.*, 1998). As concentrações de Cistatina C não foram afetadas pelo uso de corticosteroide em altas doses, utilizado na terapia da síndrome nefrótica sensível a corticosteroide em crianças (Bökenkamp *et al.*, 2002).

Por ser absorvida e catabolizada quase completamente, a Cistatina C está presente em baixas concentrações na urina. No soro é encontrada em indivíduos saudáveis em uma concentração média de 0,9 mg/L, sendo que no LCR apresenta valores maiores, não só em adultos como também em crianças menores de um ano de idade, devido à presença no sistema nervoso central de células especializadas que produzem grandes quantidades desta proteína (Löfberg *et al.*, 1980; Cruz *et al.*, 1999).

Para a população pediátrica, com mais de um ano de vida e sem doença renal, os valores encontram-se na faixa de 0,7 a 1,38 mg/L (Bökenkamp *et al.*, 1998). Nos recém-natos, os níveis de Cistatina C são maiores (1,64–2,59 mg/L) que em adultos, provavelmente devido ao reflexo da baixa filtração glomerular nesta população. Fischbach *et al.* (2002) encontraram para crianças com menos de 18 meses de vida, valores para Cistatina C sérica entre 0,70 a 1,18 mg/L.

Valores de referência para a determinação da Cistatina C, medida por nefelometria ou turbidimetria estão descritos observados na Tabela IV.

Cistatina C e variabilidade biológica

A razão entre a variabilidade biológica intraindividual (CV_i) e interindividual (CV_c), definida como índi-

TABELA IV
Valores de referência para Cistatina C em diferentes líquidos biológicos

Amostras	Média (mg/L)	Amplitude de variação	Fonte
Soro (neonatos, 1º dia)	2,20	1,55–2,98	Mussap <i>et al.</i> , 1998
Soro (neonatos, 3º dia)	1,82	1,38–2,67	Mussap <i>et al.</i> , 1998
Soro (neonatos, 1–3 dias)	2,16	1,64–2,59	Bökenkamp <i>et al.</i> , 1998
Soro (recém-natos, 3–30 dias)	1,59	1,08–2,30	Bökenkamp <i>et al.</i> , 1998
Soro (crianças, 2–4 meses)	1,59	1,05–2,30	Bökenkamp <i>et al.</i> , 1998
Soro (crianças, > 4 meses)	1,34	1,05–1,52	Bökenkamp <i>et al.</i> , 1998
Soro (crianças, > 1 ano)	1,04	0,70–1,38	Bökenkamp <i>et al.</i> , 1998
Soro (adultos)	0,90	0,6–1,20	Kyhse-Andersen <i>et al.</i> , 1994
Soro (adultos)	1,25	–	Newman <i>et al.</i> , 1995
Soro (adultos, 20 a 50 anos)	0,96	0,70–1,21	Norlund <i>et al.</i> , 1997
Soro (adultos, > 50 anos)	1,20	0,84–1,55	Norlund <i>et al.</i> , 1997
Urina (amostra ao acaso)	0,10	0,03–0,30	Löfberg e Grubb, 1979
Líquido cefalorraquiano (LCR)	5,80	3,20–12,50	Löfberg <i>et al.</i> , 1980
Líquido amniótico	1,00	0,80–1,40	Löfberg <i>et al.</i> , 1980
Líquido seminal	50	41–62	Grubb <i>et al.</i> , 1983

TABELA V
Variabilidade biológica e analítica para Cistatina C e creatinina sérica

Analito	CV _a (%)	CV _i (%)	CV _G (%)	I.I.	Diferença crítica (%)
Cistatina C	8,9	13,3	8,1	1,64	44,3
Creatinina sérica	3,1	4,9	18,2	0,27	16,1

CV_a=Coeficiente de Variação analítica; CV_i=Coeficiente de Variação biológica intra-individual; CV_G=Coeficiente de Variação biológica interindividual; I.I.=Índice de Individualidade (CV_i/CV_G); Diferença crítica=2,77[(CV_a)² + [(CV_i)²]^{1/2}. Adaptado de Keevil *et al.* (1998).

ce de individualidade (I.I.=CV_i/CV_G), fornece informações relevantes na escolha de um ensaio laboratorial. Segundo Harris *et al.* (1974), quando o índice de individualidade (I.I.) de um ensaio laboratorial é ≤ 0,6 a utilização de valores de referência, baseados em dados populacionais, são de valor limitado na detecção de resultados incomuns para um indivíduo particular. No entanto, quando o I.I. é ≥ 3 1,4 a variação de um indivíduo particular estará próxima à dos limites dos valores de referência populacionais, facilitando o uso diagnóstico deste marcador. Keevil *et al.* (1998) em estudo sobre a variabilidade biológica encontraram valores para o índice de individualidade de 1,64 e 0,27, para Cistatina C e creatinina sérica, respectivamente (Tabela V).

O elevado índice de individualidade da Cistatina C, incomum em ensaios laboratoriais, sugere que a determinação de Cistatina C pode ser mais útil no diagnóstico da lesão renal, enquanto a creatinina sérica, que apresenta baixo índice de individualidade, pode ser melhor no monitoramento da enfermidade renal (Fraser, 2001). Desta forma, quando um indivíduo ultrapassa seu coeficiente de variação biológico (CV_i) para Cistatina C (Fig.4-B), ele está próximo a ultrapassar os valores de referência, o que não ocorre com a creatinina sérica (Fig.4-A).

Dois resultados consecutivos de um mesmo paciente devem diferir em pelo menos 44% e 16% (diferença crítica, Tabela V), respectivamente, para Cistatina C e creatinina sérica para serem estatisticamente diferentes, considerando uma probabilidade de 5%. Os valores expressivamente superiores para a diferença crítica da Cistatina C, em comparação com a creatinina sérica reforçam que a Cistatina C não é tão sensível quanto a última para a detecção de mudanças dentro de um mesmo indivíduo (Keevil *et al.*, 1998).

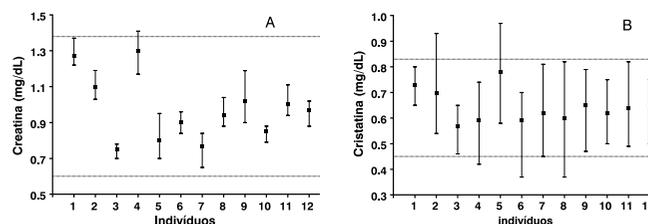


FIG.4 - Média e amplitude de variação para as determinações de (A) creatinina sérica e (B) Cistatina C de 12 indivíduos adultos normais obtidos de 10 determinações com duas tomadas de amostra por semana. As linhas pontilhadas representam os valores de referência para a população estudada. Dados adaptados de Keevil *et al.* (1998).

TABELA VI
Principais características da Cistatina C

Cistatina C	Características
Sinônimos	Post-gama, post-gama globulina, g-trace
Peso molecular	~ 13 kDa
Ponto Isoelétrico	~ 9,3
Estrutura	120 aminoácidos / duas pontes de enxofre. Molécula elipsóide.
Local de produção	Células nucleadas com síntese em velocidade constante.
Uso diagnóstico	Marcador de função renal, sendo indicador da filtração glomerular. Livramento filtrado pelo glomérulo é reabsorvida quase que totalmente no túbulo proximal e degradada nas células tubulares, não retornando à circulação. Não sofre variações expressivas com idade, sexo e massa corporal.
Metodologia usual	Imunonefelmotria/imunoturbidimetria
Amostra	Soro ou plasma heparinizado
Valores de referência (adultos)	0,6 a 1,2 mg/L
Valores de cut off sugeridos	~ 1,4 mg/L
Variabilidade analítica (nefelometria)	~ 1,2 a 5% (CV interensaio)
Variabilidade biológica (CV %)	Intra-individual ~ 13,3% Interindividual ~ 8,1%

Segundo Grubb e Löfberg (1982); Schemesh *et al.* (1985); Kyhse-Andersen *et al.* (1994); Finney *et al.* (1997); Dati (1998); Dade Behring (1999).

A Tabela VI destaca resumidamente as principais propriedades da Cistatina C com referência ao seu uso marcador da função renal.

Em resumo, a literatura aponta a quantificação sérica da Cistatina C como um bom marcador da função de filtração glomerular e um ensaio potencial para ser incluído na rotina do laboratório. Vários estudos apontam a quantificação sérica da Cistatina C como superior às determinações de creatinina sérica e ao clearance de creatinina em sensibilidade e especificidade. O uso da Cistatina C pode ser particularmente útil para a população pediátrica.

REFERÊNCIAS

1. Abrahamson, M.; Buttle, D. J.; Mason, R. W.; Hansson, H.; Grubb, A. Lijja, H.; Ohlsson, K. Regulation of cystatin C activity by serine proteinases. *Biomed. Biochim. Acta*, v. 50, p. 587-593, 1991.
2. Bethea, M.; Forman, D. T. β_2 -microglobulin: its significance and clinical usefulness. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, v. 20, p.163 – 168, 1990.
3. Bökenkamp, A.; Domanetzki, M.; Zinck, R.; Schumann, G.; Brodehl, J. Reference values of cystatin C serum concentrations in children. *Pediatr. Nephrol.*, v.12, p.125-129, 1998.
4. Bökenkamp, A.; Van Wijk, J. A.; Lentze, M. J.; Stoffel-Wagner, B. Effect of Corticosteroid Therapy on Serum Cystatin C and β_2 -Microglobulin Concentrations. *Clin. Chem.*, v. 48, p. 1123-1126, 2002.
5. Burtis, C. A.; Ashwood, E. R. (ed). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd ed. Philadelphia: Saunders, 1999, p. 1253-1254

6. Butler, E. A.; Flynn, F. V. The occurrence of post-gamma protein in urine: a new abnormality. *J. Clin. Pathol.*, v.14, p. 172-178, 1961.
7. Caregaro, L.; Menon, F.; Angeli, P.; Modio, P.; Merkel, C.; Bortoluzzi, A.; Alberino, F.; Gatta, A. Limitations of serum creatinine level and creatinine clearance as filtration markers in cirrhosis. *Arch. Intern. Med.*, v. 154, p. 201-205, 1994.
8. Crawford, F. C.; Freeman, M. J.; Schinka, J. A.; Abdullah, L. I.; Gold, M.; Krivian, K.; Morris, M. D.; Richards, D.; Duara, R.; Anand, R.; Mullan, M.J. A polymorphism in the cystatin C gene is a novel risk factor for late-onset Alzheimer's disease. *Neurology*, v. 55, p. 763 – 768, 2000.
9. Cruz, A. R.; Veiga, S. R.; Martinez, T. C.; Carballeira, M. O. L.; Valcarce, J.C.T. Algumas considerações práticas com respeito ao uso clínico de la cistatina C sérica como marcador de filtração glomerular. *Rev. Clin. Esp.*, v. 99, p.193-197, 1999.
10. Dade Behring – N Latex cystatin C – informações técnicas do reagente, março de 1999.
11. Dati, F. Urine proteins as markers of kidney diseases. *Diagn. Endocrinol. e Metab.*, v.16, p.103-113, 1998.
12. Deng A., Irizarry M.C., Nitsch R.M., Growdon J.H., Rebeck G.W. Elevation of cystatin C in susceptible neurons in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.*, v. 159, p.1061-1068, 2001.
13. Dhanidharka, V. R.; Kwon, C.; Stevens, G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am. J. Kidney Dis.*, v. 40, p.221-226, 2002.
14. Finckh, U.; Von Der Kammer, H.; Velden, J.; et al. Genetic association of a cystatin C gene polymorphism with late-onset Alzheimer disease. *Arch. Neurol.*, v. 57, p. 1579- 1583, 2000.
15. Finney, H.; Newman, D. J.; Gruber, W.; Merle, P.; Price, C. P. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BNII). *Clin. Chem.*, v. 43, p.1016-1022, 1997.
16. Fischbach, M.; Graff, V.; Terzic, J.; Bergere, V.; Oudet, M.; Hamel, G. Impact of age on reference values for serum concentration of cystatin C in children. *Pediatr. Nephrol.*, v. 17, p. 104- 106, 2002.
17. Fraser, C.G. *Biological variation: from principles to practice*. AACCC Press: Washington, 2001, p.120-1.
18. Goates, J. J.; Morton, K. A.; Whoooten, W. W.; Greenberg, H. E.; Datz, F. L.; Handy, J. E. Scuderi, A. J.; Haakenstad, A. O.; Lynch, R. E. Comparison of methods for calculating glomerular filtration rate: Technetium-99m-DTPA scintigraphic analysis, protein-free and whole-plasma clearance of Technetium-99m-DTPA and iodine-125-iothalamate clearance. *J. Nucl. Med.*, v.31, p. 424-429, 1990.
19. Grubb, A.; Weber, H.; Löfberg, H. The γ -trace concentrations of normal human seminal plasma is thirty-six times that of human blood plasma. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 43, p. 421-425, 1983.
20. Grubb, A.; Lofberg, H. Human γ -trace, a basic microprotein: aminoacid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v. 79, p. 3024-3027, 1982.
21. Grubb, A.; Simonsen, O.; Sturfelt, G.; Truedsson, L.; Thysell, H. Serum concentration of cystatin C, factor D and β_2 -microglobulin as a measure of glomerular filtration rate. *Acta. Med. Scand.*, v. 218, p. 499-503, 1985.
22. Hagstam, K. E.; Nordenfeld, I.; Svensson, L.; Svensson, S. E. Comparison of different methods for determination of glomerular filtration rate in renal diseases. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 34, p.31-36, 1974.
23. Harmoinen, A. P.; Kouri, T. T.; Wirta, O. R.; Lehtimäki, T. J.; Rantalaiho, V.; Turjanmaa, V. M.; Pasternack, A. I. Evaluation of plasma cystatin C as a marker for glomerular filtration rate in patients with type 2 diabetes. *Clin. Nephrol.*, v. 52, p.363-370, 1999.
24. Harris, E. K. Effects of intra- and interindividual variation on the appropriate use of normal range. *Clin Chem.*, v. 20, p. 1535 – 1542, 1974.
25. Helin, I.; Axenram, M.; Grubb, A. Serum cystatin C as a determinant of glomerular filtration rate in children. *Clin. Nephrol.*, v. 49, p. 221-225, 1998.
26. Henry, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamento Por Métodos Laboratoriais*. 18ª ed. São Paulo: Manole, 1995, p.459.
27. Heysfield, S. B.; Arteaga, C.; Mcmanus, C.; Smith, J.; Moffitt, S. Measurement of muscle mass in humans: validity of the 24-hour urinary creatinine method. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 37, p. 478-494, 1983.
28. Hochwald, G. M.; Thorbecke, G. J. Use of an antiserum against cerebrospinal fluid in demonstration of trace proteins in biological fluids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.109, p. 91-95, 1962
29. James, G. D.; Sealey, J. E.; Alderman, M.; Ljunman, S.; Mueller, F.B.; Pecker, M. S.; Laragh, J. H. A longitudinal study or urinary creatinine and creatinine clearance in normal subjects. Race, sex, and age differences. *Am. J. Hypertens.*, v. 1, p. 124-131, 1988.
30. Jung, K.; Jung, M. Cystatin C: a promising marker of glomerular filtration rate to replace creatinine. *Nephron*, v. 70, p. 370-371, 1995.
31. Kazama, J. J.; Kutsuwada, K.; Ataka, K.; Maruyama, H.; Gejyo, F. Serum Cystatin C reliably detects renal dysfunction in patients with various renal diseases. *Nephron*, v. 91; p. 13 – 20, 2002.
32. Keevil, B. G.; Kilpatrick, E. S.; Nichols, S. P.; Maylor, P. W. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. *Clin. Chem.*, v. 44, p.1535-1539, 1998.
33. Krutzen, E.; Back, S. E.; Nilsson-Ehle, I.; Nilsson-Ehle, P. Plasma clearance of a new contrast agent, iohexol: A method for determination of glomerular filtration rate. *J. Lab. Clin. Med.*, v. 104, p. 955-961, 1984.
34. Kyhse-Anderson, J.; Schmidt, C.; Nordin, G.; Andersson, B.; Nilsson-Ehle, P.; Lindstrom, V.; Grubb, A. Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin. Chem.*, v. 40, p. 1921-1926, 1994.
35. Laterza, O.F.; Price, C.P.; Scott, M.G. Cystatin C: An Improved Estimator of Glomerular Filtration Rate? *Clin. Chem.*, v.48, p. 699-707, 2002.
36. Le Bricon, T.; Thervet, E.; Froissart, M.; Benlakehal, M.; Bousquet, B.; Legendre, C.; Erlich, D. Plasma cystatin C is superior to 24-h creatinine clearance and plasma creatinine for estimation of glomerular filtration rate 3 months after kidney transplantation. *Clin. Chem.*, v. 46, p. 1206-1207, 2000.
37. Levey, A.S.; Berg, R. L.; Gassman, J. J.; Hall, P. M.; Walker, W. G. Creatinine filtration, secretion and excretion during progressive renal disease. *Kidney Int.*, (suppl.) v. 36, p. S73-S80, 1989.
38. Löfberg, H.; Grubb, A.; Sveger, T.; Olsson, J. E. The cerebrospinal fluid and plasma concentrations of γ -trace and β -microglobulin at various ages and in neurological disorders. *J. Neurol.*, v. 223, p. 159-170, 1980.
39. Löfberg, H.; Grubb, A. Quantitation of γ -trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 39, p. 619-626, 1979.
40. Mangge, H.; Liebmann, P.; Tanil, H.; Herrmann, J.; Wagner, C.; Gallistl, S.; Schauenstein, K.; Erwa, W. Cystatin C, an early indicator for incipient renal disease in rheumatoid arthritis. *Clin. Chim. Acta.*, v. 300, p. 195-202, 2000.
41. Marshall, W. J.; Bangert, S. K. *Clinical Biochemistry. Metabolic and clinical aspects*. Churchill Livingstone: New York, 1995, 124 – 9.
42. Maruyama, H.; Izumi, Y.; Oda, M.; Torii, T.; Morino, H.; Toji, H.; Sasaki, K.; Terasawa, H.; Nakamura, S.; Kawakami, H. Lack association between Cystatin C gene polymorphism in Japanese patients with Alzheimer disease. *Neurology*, v. 57, n. 2, p. 337 – 339, 2001.
43. Mojiminiyi, O.A.; Marouf, R.; Abdella, N.; Kortom, M.; Abdul-Razzak, R. Serum concentration of Cystatin C is not affected by cellular proliferation in patients with proliferation haematological disorders. *Ann. Clin. Biochem.*, v. 39, n. 3, p. 308 – 310, 2002.
44. Mussap, M.; Ruzzante, N.; Varagnolo, M.C.; Plebani, M. Quantitative automated particle-enhanced immunonephelometric assay for routine measurement of human cystatin C. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v. 36, n. 11, p. 859-865, 1998.
45. Newman, D. More on Cystatin C. *Clin. Chem.*, v. 45, p. 718-719, 1999.
46. Newman, D.J.; Thakkar, H.; Edwards, R.G.; Wilkie, M.; White, T.; Grubb, A.O.; Price, C.P. Serum cystatin C measured by automated immunoassays: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int.*, v. 47, p. 312-318, 1995.
47. Norlund, L.; Fex, G.; Lanke, J.; Von Schenck, H.; Nilsson, J. E.; Leksell, H.; Grubb, A. Reference intervals for the glomerular filtration rate and cell-proliferation markers: serum cystatin C and serum β_2 -microglobulin/cistatin C-ratio. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 57, p. 463 – 470, 1997.
48. Orlando, R.; Mussap, M.; Plebani, M.; Piccoli, P.; De Martin, S.; Floreani, M.; Padrini, R.; Palatini, P. Diagnostic Value of Plasma Cystatin C as a Glomerular Filtration Marker in Decompensated Liver Cirrhosis. *Clin. Chem.*, v. 48, n. 6, p. 850-858, 2002.
49. Perrone, R.D.; Madias, N.E.; Levey, A.S. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin. Chem.*, v. 38, p. 1933-1953, 1992.
50. Plebani, M.; Dall'amico, R.; Mussap, M.; Montini, R.; Ruzzante, N.; Marsilio, R.; Giordano, G.; Zaccello, G. Is serum cystatin C a sensitive marker of glomerular filtration rate (GFR)? A preliminary study on renal transplant patients. *Ren. Fail.*, v. 20, n. 2, p. 303-309, 1998.
51. Randers, E., Kristensen, J.H., Erlandsen, E.J., Danielsen, H. Serum cystatin C as a marker of the renal function. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 58, p. 585-592, 1998.
52. Randers, E.; Erlandsen, E. J. Serum Cystatin C as an endogenous marker of the renal function—a review. *Clin. Chem. Lab. Med.*, v. 37, p. 389-395, 1999.
53. Randers, E.; Ivarsen, P.; Erlandsen, E.J.; Hansen, E.F.; Aagaard, N.K.; Bendtsen, F.; Vilstrup, H. Plasma cystatin C as a marker of renal function in patients with liver cirrhosis. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 62, p. 129 – 34, 2002.
54. Rehling, M.; Rabol, A. Measurement of glomerular filtration rate in adults: accuracy of five single-sample plasma clearance methods. *Clin. Physiol.*, v. 9, p. 171-182, 1989.
55. Stabuc, B.; Vrhovec, L.; Stabuc-Silih, M.; Cizej, T.E. Improved prediction or decreased creatinine clearance by serum cystatin C: use in cancer patients before and during chemotherapy. *Clin. Chem.*, v. 46, p. 193-197, 2000.
56. Shemesh O.; Golbetz, H.; Kriss, J.P.; Myers, B.D. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int.*, v. 28, p. 830-838, 1985.
57. Stickie, D.; Cole, B.; Hock, K.; Hruska, K. A.; Scott, M. G. Correlation of plasma concentrations of cystatin C and creatinine to inulin clearance in a pediatric population. *Clin. Chem.*, v. 44, p.1334-1338, 1998.
58. Strasinger, S. K. *Uroanálise e Fluidos Biológicos*. 3 ed. São Paulo: Premier, 1996, p.13.
59. Strevens, H., Wide-Svensson, D., Grubb, A. Serum cystatin C is a better marker for preclampsia than serum creatinine or serum urate. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 61, p. 575-580, 2001.
60. Strevens, H., Wide-Svensson, D., Torffvit, O.; Grubb, A. Serum Cystatin C for assessment of glomerular filtration rate in pregnant and non-pregnant women. Indications of altered filtration process in pregnancy. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, v. 62, p. 141-147, 2002.
61. Takabatake, T.; Ohta, H.; Ishida, Y.; Hara, H.; Ushioji, Y.; Hattori, N. Low serum creatinine levels in severe hepatic disease. *Arch. Intern. Med.*, v. 148, p. 1313-1315, 1988.
62. Walmsley, R.N.; White, G.H. *A guide to diagnostic clinical chemistry*. 3ª ed. Blackwell: London, 1994, p.158-9.
63. Wasén, E.; Suominen, P.; Isoaho, R.; Mattila, K.; Virtanen, A.; Kivelä, S.-L.; Irjala, K. Serum cystatin C as a marker of kidney dysfunction in an elderly population. *Clin. Chem.*, v. 48, p. 1138-40, 2002.
64. Woitas, R. P.; Stoffel-Wagner, B.; Flommersfeld, S.; Poegeu, U. Schiedermaier, P.; Klehr, H.U.; Spengler, U.; Bidlingmaier, F.; Sauerbruch, T. Correlation of serum concentrations of cystatin C and creatinine to inulin clearance in liver cirrhosis. *Clin. Chem.*, v. 46, p.712-715, 2000.
65. Ylisen, E.A.; Ala-Houhala, M.; Harmoinen, A.P.; Knip, M. Cystatin C as a marker for glomerular filtration rate in pediatric patients. *Pediatr. Nephrol.*, v. 13, p. 506-509, 1999.

Endereço para correspondência

Geraldo Picheth
 Laboratório de Bioquímica Clínica – Curso de Farmácia
 Rua Prefeito Lothário Meissner, 3400 – Jardim Botânico
 80210-170 - Curitiba, PR /E-mail: gpicheth@ufpr.br
 Toni Ricardo Martins
 Rua Francisco de Paula Seara, 297
 88303-390 - Itajaí, SC
 E-mail: trmartins@terra.com.br

Prevalência de enteroparasitos em moradores de vilas periféricas de Porto Alegre, RS

Survey of intestinal parasites among inhabitants of Porto Alegre Metropolitan area

Márcio de Assis; Fernanda P. Borges; Roberto C. V. Santos; Adroaldo Lunardelli; Patrick B. Gaspareto; Cássio M. Graziottin; Rafael V. Michel, Tiana Tasca & Geraldo A. De Carli

RESUMO – Realizou-se um trabalho integrado de pesquisa e extensão comunitária com o objetivo de determinar a prevalência das enteroparasitoses na vila Fátima (Mato Sampaio), Campo da Tuca e Vila dos Papeleiros, vilas periféricas de Porto Alegre. Este estudo foi realizado durante os anos de 1999 e 2002 em uma população de 594 pessoas, todas residentes nestas vilas. As amostras fecais foram examinadas pela técnica de Hoffman, Pons e Janer. O maior percentual geral de infecção obtido para nematóides foi de 39,5% (235) para *Ascaris lumbricoides* e, entre os protozoários, a *Giardia lamblia* com 18,0% (107). As altas taxas de enteroparasitos entre crianças e adultos jovens moradores destas vilas mostrou o baixo nível sócio-econômico, a falta de escolaridade e a inexistência de saneamento básico.

PALAVRAS-CHAVE – Prevalência, enteroparasitoses, levantamento epidemiológico.

SUMMARY – An integrated programme of studies on prevalence of intestinal parasite infections was performed between 1999 and 2002, in inhabitants of the metropolitan area of Porto Alegre, RS. In order to determine the prevalence rate of intestinal parasites in this population a total of 594 stools specimens were collected. The samples were examined by Hoffman, Pons and Janer technique. The results revealed that *Ascaris lumbricoides* (39.5%) and *Giardia lamblia* (18.01%) were the predominant intestinal parasite in the present survey.

KEYWORDS – Intestinal parasites, survey, integrated program, epidemiology.

INTRODUÇÃO

A transmissão dos enteroparasitos está diretamente relacionada com as condições de vida e de higiene das comunidades urbanas e rurais. A alta prevalência de parasitos entre as populações de baixo nível sócio-econômico é resultante do padrão de vida, de higiene e de educação, os quais, são inadequados e deficientes (De Carli & Candia 1992). No Brasil, as enteroparasitoses figuram entre os principais problemas de saúde pública e, no entanto, a investigação dessas doenças tem sido amplamente negligenciada (De Carli *et al.*, 1997). As campanhas de controle e erradicação das enteroparasitoses não requerem grandes financiamentos, capacidade humana e complexo equipamento médico de alta tecnologia, mas de uma imediata conscientização das populações sobre higiene, educação sanitária e de uma urgente campanha de tratamento em massa (De Carli *et al.*, 1994, 1997). Nas favelas, compostas por conjuntos de casebres, usualmente com baixas medidas sanitárias, com o meio ambiente poluído, vivem pessoas doentes, especialmente crianças e adultos jovens. Algumas favelas estão situadas nas proximidades dos depósitos de lixo, enquanto outras, perto dos limites do esgoto (De Carli 1998). Os parasitos intestinais estão entre os parasitos mais freqüentemente encontrados nos seres humanos. Os helmintos mais freqüentes são *Ascaris lumbricoides* e *Trichuris trichiura* e entre os protozoários, a *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*.

Estima-se que cerca de 1 bilhão de indivíduos no mundo alberguem *G. lamblia* e *E. histolytica*. Os danos que os enteroparasitos podem causar a seus portadores

incluem, entre outros, a obstrução intestinal (*A. lumbricoides*), a desnutrição (*A. lumbricoides* e *T. trichiura*), a anemia por deficiência de ferro (ancilostomídeos) e quadros de diarreia e de má absorção (*E. histolytica* e *G. lamblia*), sendo que as manifestações clínicas são usualmente proporcionais à carga parasitária albergada pelo indivíduo (Ferreira *et al.*, 2000).

Na Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), a disciplina de Parasitologia Clínica realiza anualmente estudos epidemiológicos coparassitológicos em diferentes comunidades. Esta pesquisa é a etapa inicial de um estudo sobre a transmissão de parasitos intestinais na Vila Fátima (Mato Sampaio), Vila dos Papeleiros, e Campo da Tuca, situadas na periferia da cidade de Porto Alegre (RS). O objetivo deste trabalho foi estabelecer e avaliar a prevalência das enteroparasitoses nas crianças e nos adultos jovens residentes nessas vilas.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo: Foram estudados 594 moradores, residentes na Vila dos Papeleiros, Vila Fátima (Mato Sampaio) e Campo da Tuca, na cidade de Porto Alegre, RS, durante o período de agosto de 1999 a agosto de 2002. A Vila Fátima (Mato Sampaio) apresenta uma população estimada de 11.700 habitantes, totalizando um número de 2.500 famílias, localizada no bairro Bom Jesus, Região 2: Leste, Nordeste e eixo Baltazar. A Vila dos Papeleiros fica na Avenida Castelo Branco e Rua Voluntários da Pátria, zona Norte de Porto Alegre, com aproximadamente 600 pessoas. O Campo da Tuca localiza-se no bairro Partenon. Estas vilas foram implanta-

Recebido em 17/4/2003

Aprovado em 14/5/2003

Laboratório de Parasitologia Clínica, Faculdade de Farmácia, PUCRS, Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, RS, 90619-900, Brasil

das fora do perímetro urbano, sendo habitadas por uma população heterogênea. As casas não são padronizadas, possuindo um ou dois dormitórios, cozinha e sanitário. A grande maioria das residências possui latrina fora da casa. Algumas casas são servidas pela rede de água, enquanto outras têm poço próprio, cisterna ou reservatório. O lixo, em raras casas, é removido diariamente, em outras, ele é queimado, enterrado ou deixado exposto em monturos sobre o solo. As ruas não são pavimentadas e nem calçadas. A população, de maneira geral, é constituída por mecânicos, motoristas, comerciantes, funcionários públicos, domésticas, pintores, pedreiros e principalmente catadores de papel.

Colheita da amostra: Na primeira visita às vilas, após a motivação das crianças e adultos jovens sobre os problemas de higiene e educação sanitária, foram distribuídos recipientes para a colheita das fezes. Foi examinada apenas uma amostra de cada pessoa, dentro de um período de 12 horas, após a colheita.

Método de exame: O procedimento usado para o exame parasitológico das fezes foi a técnica da sedimentação, espontânea (Hoffman, Pons e Janer, 1934, Lutz 1919). Foi examinada uma amostra de cada pessoa. Devido às dificuldades impostas pelas crianças e adultos jovens não foi possível realizar o método da fita de celofane adesiva e transparente para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis* em toda a população estudada. Todos os exames foram realizados no Laboratório de Parasitologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, (PUCRS). Foram observados os corretos procedimentos quanto ao controle de qualidade; preparação adequada da amostra; armazenamento e preservação dos espécimes submetidos ao diagnóstico; monitoramento do equipamento; correta supervisão e treinamento da equipe; uso de manuais de procedimentos, revistas científicas específicas e referências bibliográficas, as quais sempre estavam à disposição dos alunos (De Carli e Oliveira 1999).

RESULTADOS

Pelos dados observados das 594 amostras analisadas, 69,5% (413) apresentaram resultados positivos e 30,5% (181) foram negativas para parasitos intestinais (Tabela I). A análise dos resultados mostrou que a Vila dos Papeleiros apresentou índice de infecção igual a 81,7% (183), enquanto na Vila Fátima e Campo da Tuca a prevalência de parasitos foi de 71,2% (99) e 56,7% (131) respectivamente.

TABELA I
Prevalência de enteroparasitos em uma população de 594 pessoas da Vila do Papeleiros, Vila Fátima (Mato Sampaio) e Campo da Tuca

Nº de amostras examinadas	Amostras positivas	Amostras negativas
594 (100,0%)	413 (69,5%)	181 (30,5%)

TABELA II
Prevalência de enteroparasitos em uma população de 594 pessoas residentes na Vila dos Papeleiros, Vila Fátima (Mato Sampaio) e Campo da Tuca

Origem das amostras	Nº de amostras examinadas	Amostras positivas	Amostras negativas
Vila dos Papeleiros	224 (100,0%)	183 (81,7%)	41 (18,3%)
Vila Fátima	139 (100,0%)	99 (71,2%)	40 (28,8%)
Campo da Tuca	231 (100,0%)	131 (56,7%)	100 (43,3%)

TABELA III
Distribuição específica de parasitos intestinais em 594 pessoas na Vila dos Papeleiros, Vila Fátima (Mato Sampaio) e Campo da Tuca

Parasitos	Frequência*	(%)
• Helmintos		
<i>Ascaris lumbricoides</i>	235	39,5
<i>Trichuris trichiura</i>	188	31,6
<i>Enterobius vermicularis</i>	2	0,3
<i>Strongyloides stercoralis</i>	13	2,2
<i>Taenia</i> spp.	1	0,1
<i>Hymenolepis nana</i>	26	4,4
Total	465	78,1
• Protozoários		
<i>Entamoeba histolytica/E. dispar</i> **	10	1,7
<i>Entamoeba coli</i>	85	14,3
<i>Endolimax nana</i>	65	10,9
<i>Iodamoeba butschlii</i>	1	0,1
<i>Giardia lamblia</i>	107	18,0
Total	268	45,0

* Muitas amostras contêm mais de um parasito.

**O diagnóstico laboratorial diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* não pode ser realizado tomando como base a morfologia, a não ser que sejam vistas hemácias ingeridas pelos trofozoítos (*E. histolytica*). *E. histolytica* é usado para designar a existência de zimodemos patogênicos, enquanto *E. dispar* é agora usado para designar a existência de zimodemos não-patogênicos.

TABELA IV
Associações de parasitos intestinais mais frequentes em infecções concomitantes por helmintos e protozoários na Vila dos Papeleiros, Vila Fátima (Mato Sampaio) e Campo da Tuca

Associações (n = 224)	Frequência*	(%)
Helmintos + Helminto	79	13,3
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	64	10,8
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>H. nana</i>	06	1,0
<i>A. lumbricoides</i> + <i>H. nana</i>	05	0,8
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>S. stercoralis</i>	04	0,7
Protozoários + Protozoário	13	2,2
<i>E. coli</i> + <i>G. lamblia</i>	05	0,8
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i>	04	0,7
<i>G. lamblia</i> + <i>E. histolytica/E. dispar</i> *	02	0,3
<i>E. coli</i> + <i>E. nana</i> + <i>E. histolytica/E. dispar</i> *	01	0,2
<i>G. lamblia</i> + <i>E. nana</i>	01	0,2
Helmintos + Protozoário	59	9,9
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>E. coli</i>	12	2,0
<i>A. lumbricoides</i> + <i>E. coli</i>	12	2,0
<i>A. lumbricoides</i> + <i>G. lamblia</i>	11	1,8
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>G. lamblia</i>	10	1,7
<i>T. trichiura</i> + <i>G. lamblia</i>	07	1,2
<i>A. lumbricoides</i> + <i>E. nana</i>	04	0,7
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>E. nana</i>	03	0,5
Outras associações	73	12,3

* O diagnóstico laboratorial diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *E. dispar* não pode ser realizado tomando como base a morfologia, a não ser que sejam vistas hemácias ingeridas pelos trofozoítos (*E. histolytica*). *E. histolytica* é usado para designar a existência de zimodemos patogênicos, enquanto *E. dispar* é agora usado para designar a existência de zimodemos não-patogênicos.

mente (Tabela II). O monoparasitismo apresentou taxas de infecção iguais a 31,8% (189/413) e o poliparasitismo 37,7% (224/413). A Tabela III expressa a distribuição específica de enteroparasitos, sendo que os maiores percentuais de infecção foram obtidos para *A. lumbricoides* (39,5%) e *T. trichiura* (31,6%) entre os helmintos e *G. lamblia* (18,0%) e *Entamoeba coli* (14,3%) entre os protozoários. A Tabela IV mostra as associações dos parasitos mais frequentes em infecções concomitantes por helmintos e protozoários e permitiu verificar que as combinações mais amiudadamente repetidas foram: *A. lumbricoides* + *T. trichiura* + *E. coli* (12,3%) e *A. lumbricoides* + *E. coli* (12,3%).

coides + *T. trichiura* com 10,8% (64), *A. lumbricoides*, *T. trichiura* + *G. lamblia* com 1,7% (10), *A. lumbricoides* + *E. coli* com 2,0% (12) em um total de 224 combinações.

DISCUSSÃO

Este trabalho é resultado de um relato preliminar de uma atividade de extensão comunitária da disciplina de Parasitologia Clínica, Faculdade de Farmácia da PUCRS. Esta pesquisa, realizada nas vilas marginais da grande Porto Alegre com crianças e adultos jovens, detectou altos índices de parasitos intestinais na população marginalizada estudada. Nos países tropicais em crescimento, onde o nível de higiene, educação e desenvolvimento econômico são muito baixos, o parasitismo no homem e nos animais ocorre com grande intensidade e diversidade.

A transmissão dos geohelmintos está diretamente relacionada com as condições de vida e de higiene das comunidades urbanas e rurais (De Carli, 1998). Enquanto os ovos de *A. lumbricoides* e de *T. trichiura* requerem um período de maturação de pelo menos três semanas em solo úmido e sombreado antes de se tornarem infectantes; os cistos de *G. lamblia* já são infectantes no momento de sua eliminação pelas fezes. Essa última condição permite a transmissão interpessoal da parasitose, comum mesmo em ambientes saneados (Ferreira *et al.*, 2000).

Assim, é importante salientar que em nosso trabalho foram demonstrados altos índices de positividade, ou seja 39,5% (235) para o *A. lumbricoides* e 31,6% (188) para o *T. trichiura* e 18,0% (107) para a *G. lamblia*. Estudos realizados por Ferreira e Junior (1996) apontaram a giardíase como uma das principais parasitoses intestinais entre as crianças brasileiras.

Alterações dos hábitos alimentares, perda de apetite, desnutrição e balanço negativo de nitrogênio, são pontos freqüentes e comuns nas infecções crônicas destas populações marginalizadas. As dificuldades no crescimento poderão estar relacionadas com a insuficiência de alimentos e mau aproveitamento dos nutrientes e/ou por um decaimento físico e mental, devido à uma parasitose intestinal (De Carli, 1995).

O poliparasitismo (37,35%) reforçou esta afirmação, nos estudos realizados por De Carli *et al.* (1989) nas vilas marginais da Grande Porto Alegre, onde a florescente natureza do parasitismo nas populações estudadas apresentou uma ocorrência de três a quatro espécies de enteroparasitos nas pessoas estudadas.

De Carli *et al.* (1992) mostraram que o parasitismo foi igual a 68,9% (11.341) em uma população 16.460 pessoas, todos residentes em 33 vilas periféricas da cidade de Porto Alegre. De Carli *et al.*, (1994,1997) descreveram nos assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos, RS, em uma população 17.951, índices de infecção iguais a 66,0% (11.855).

A maior prevalência de infecção com helmintos transmitidos pelo solo (*A. lumbricoides*, *T. trichiura*, Ancilostomídeos e *S. stercoralis*) pode ser atribuída em grande parte aos fatores climáticos, além da baixa educação sanitária. As infecções pelo *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *G. lamblia* foram as mais prevalentes nesse estudo, os quais apresentaram maiores índices de positividade entre os moradores das vilas periféricas.

Os resultados obtidos neste estudo coproparasitológico mostraram a imperiosa necessidade de levar a essas comunidades noções básicas de higiene e de educação sanitária. O encontro de cistos de *E. coli* e *Endolimax nana*, parasitos não patogênicos, reafirma que o saneamento básico e a educação sanitária são as mais importantes medidas administrativas que deverão ser implantadas.

A ausência e/ou insuficiência de condições mínimas de saneamento básico e práticas inadequadas de higiene pessoal e doméstica são os principais mecanismos de transmissão dos parasitos intestinais. Provavelmente, estes ambientes encontram-se contaminados por ovos e larvas de helmintos intestinais, devido à disposição inadequada de excretas humanas e de esgotos sanitários, contribuindo dessa maneira para a disseminação dos parasitos (Prado *et al.*, 2001). No caso específico das enteroparasitoses, estudos que se seguiram à intervenções maciças em saneamento do meio ambiente têm demonstrado que melhorias no abastecimento de água e no esgotamento sanitário se traduzem em declínios substanciais, sobretudo das helmintíases (Ferreira *et al.*, 2000).

A maior prevalência de parasitos entre as crianças das zonas periféricas não reflete nenhuma predisposição racial, genética ou suscetibilidade à infecção, mas uma diferença na educação, na cultura e nos hábitos alimentares, os quais podem afetar a exposição à infecção (De Carli & Candia 1992; De Carli *et al.*, 1997; De Carli 1998). As crianças mais vulneráveis sofrem não só os efeitos sobre o seu estado nutricional, como também as repercussões sobre o seu estado imunológico. Apesar do grande avanço tecnológico da medicina no século XX, as enteroparasitoses ainda possuem elevada morbidade na população (De Carli 1998).

Os resultados obtidos em nosso inquérito levam a sugerir a necessidade urgente de uma campanha de educação sanitária e medidas de saneamento básico nas populações estudadas.

REFERÊNCIAS

1. De Carli, G.; Candia, E.; Nunes, E.; Silva, A.; Martins, R.; Antunes, I.; Farias, G.; Leiria, B.; Cancela, M. H. Extensão Comunitária - Estudo de enteroparasitoses e das condições sócio-econômicas e sanitárias das vilas periféricas de Porto Alegre, RS, Brasil, durante o período de 1965 a 1981. *Cad. Far.* 5:73-92, 1989.
2. De Carli, G. A.; Candia, E. F. Prevalência de geohelmintos entre escolares residentes nas vilas periféricas de Porto Alegre, RS. *Rev. Bras. Farm.* 73:7-8, 1992.
3. De Carli, G. A.; Spalding, S. M.; Rott, M.; Ribeiro, L.; Chaves, A.; da Silva, A. C.; Wendorff, A.; Matos, S.; Pozza, C. Incidência de enteroparasitoses entre colonos sem-terra nos assentamentos de Charqueadas e Capela de Santana no estado do Rio Grande do Sul. *RBAC.* 26:123-125, 1994.
4. De Carli, G. A. Controle das parasitoses intestinais através da extensão comunitária. *Acta Biol. Leopoldensia* 17:7-11, 1995.
5. De Carli, G. A.; Mentz, M.; Rott, M. B.; da Silva, A. C. A.; Wendorff, A.; Tascia, T.; Castilhos, D. S.; De Carli, G.; Montenegro, R. A.; Mylius, L. Prevalência das enteroparasitoses na população urbana e rural da região carbonífera da cidade de Arroio dos Ratos, Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Farm.* 78:83-85, 1997.
6. De Carli, G. A. A extensão universitária patrocinada e orientada pelas universidades: Um programa eficiente para a erradicação e controle das parasitoses intestinais. *PROXEST-UFRGS.* 1:09-12, 1998.
7. De Carli, G. A.; Oliveira, O. L. M. Controle de qualidade em parasitologia clínica - I. Diagnóstico microscópico dos parasitos. *RBAC* 31:159-174, 1999.
8. Ferreira, C. B.; Junior, O. M. Enteroparasitoses em escolares do distrito de Martinésia, Uberlândia, MG: Um estudo-piloto. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30:373-377, 1996.
9. Ferreira, M. U.; Ferreira, C. S.; Monteiro, C. A. Tendência secular das parasitoses intestinais na infância na cidade de São Paulo (1984-1996). *Rev. Saúde Pública.* 34:73-82, 2000.
10. Hoffman, W. A.; Pons, J. A. & Janer, S. L. The sedimentation concentration methods in schistosomiasis mansonii. Puerto Rico. *J. Publ. Hlth.* 9:281-298, 1934.
11. Lutz, A. O. *Schistosoma mansoni* e a schistosomose, segundo observações feitas no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 11:121-155, 1919
12. Prado, M. S.; Barreto, M. L.; Sprina, A.; Nobre, A. A. & Jesús, S. R. Prevalência e intensidade da infecção por parasitos intestinais em crianças na idade escolar na cidade de Salvador (Bahia, Brasil). *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34:99-101, 2001.

Endereço para correspondência

Prof. Geraldo Attilio De Carli

Av. Lucas de Oliveira, 597/302 - Mont'Serrat - 90440-011 - Porto Alegre, RS

TeleFax: (0xx51)3332-2582

E-mail: gdecarli@portoalegre.com.br