

RIBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

- Mycobacterium kansasii* em paciente imunocompetente 95**
Paulo Fausto Cauduro, Adelina Mezzari & Tereza Cristina Brodt
Mycobacterium kansasii in patient immunocompetent
- Proposta de um método alternativo para a determinação da concentração de hemoglobina 97**
Z. M. Fonteles, A. B. Lima, M. G. R. Queiroz & C. L. Melo
 Proposed an alternative method to determinate the hemoglobin concentration
- O esteatócrito: o método e suas variações 101**
Izabel Cristina Schander de Almeida & Jarbas Rodrigues de Oliveira
 The steatocrit: the method and its variations
- Fosfatase alcalina óssea em crianças e adolescentes com osteopenia colestática: estudo de dois métodos de determinação da atividade da enzima 105**
Sandra Vieira, Beatriz Amaral, Jarbas R. de Oliveira & Themis R. da Silveira
 Bone alkaline phosphatase in children and adolescents with cholestatic osteopenia: study of two methods for determination of enzymatic activity
- Efeito interferente do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos 111**
Edson L. da Silva, Emília R. Scharf, Flávia Martinello, Daniel M. de Luca, Gabriela R. Amorin, Leandro Corradi & Toni R. Martins
 Ascorbic acid interference on the measurement of serum biochemical parameters
- Cinética de remoção plasmática de quilomícrons artificiais em pacientes portadores de doença de Hodgkin e linfoma não-Hodgkin 117**
Romélia Pinheiro Gonçalves; Vânia T. M. Hungria; Sérgio Chiattne & Raul Cavalcante Maranhão
 Clearance of a chylomicron-like emulsion from plasma in patients with Hodgkin's disease and non-Hodgkin's lymphoma
- Mosaicismo cromossômico para Síndrome de Turner com deficiência estrutural do cromossomo X em forma de anel - A propósito de um caso 133**
Hemerson B. Alves, Paulo H. da Silva & Patrícia H. Gallego
 The chromosomal mosaicism for Turner's syndrome with structural deficiency of the X chromosome in ring shape - Case report
- Polimorfismo *Ava II* do gene do receptor da LDL: um marcador genético útil na avaliação da resposta terapêutica em indivíduos hipercolesterolêmicos 137**
Luis A. Salazar, Mário H. Hirata, Éder C.R. Quintão & Rosario D.C. Hirata
Ava II polymorphism at the LDL receptor gene: an useful genetic marker for evaluation of the pharmacological response in hypercholesterolemic individuals
- Diagnóstico laboratorial da *Cyclospora cayetanensis* 143**
Geraldo Attilio de Carli
 Laboratory diagnosis of *Cyclospora cayetanensis*
- Seleção e avaliação de laboratórios 151**
Prof. João Ciribelli Guimarães

3

**CINÉTICA DE REMOÇÃO PLASMÁTICA DE QUILOMÍCRONS ARTIFICIAIS EM
PACIENTES PORTADORES DE DOENÇA DE HODGKIN E LINFOMA NÃO HODGKIN**

Romélio Pinheiro Gonçalves¹.; Raul Cavalcante Maranhão².

¹Professora Adjunto do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFC.

² Professor Titular do Departamento de Análises Clínicas da USP.

INTRODUÇÃO

1. Metabolismo das lipoproteínas

O transporte dos lipídeos, no plasma, é feito por estruturas denominadas de lipoproteínas. As lipoproteínas são macroagregados moleculares de forma esférica constituídos de um núcleo hidrofóbico, que contém, principalmente, colesterol esterificado e triglicérides, envolvido por uma monocamada constituída de fosfolipídeos e colesterol livre, lipídeos anfífilicos e proteínas, denominadas apolipoproteínas (apos) (EISENBERG e col., 1984).

As apos associam-se aos lipídeos por interações não-covalentes e desempenham importante papel na estabilização estrutural, na regulação das atividades enzimáticas sobre as lipoproteínas e na mediação da captação celular das partículas por receptores específicos. São classificadas de acordo com uma nomenclatura alfa-numérica (apoA-I, A-II, B-48, B-100, C-II, C-III, por exemplo) (BREWER e col., 1988, ERKELENS, 1989).

As lipoproteínas são classificadas, de acordo com sua densidade e sua migração eletroforética (CHAPMAN e col., 1981), em:

1. quilomícrons (QM), com densidade $<0,950$ g/ml e mobilidade eletroforética nula;
2. lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), $0,95 < d < 1,005$ g/ml e mobilidade pré-beta;
3. lipoproteínas de baixa densidade (LDL), $1,019 < d < 1,063$ g/ml e mobilidade beta;
4. lipoproteínas de alta densidade (HDL), $1,063 < d < 1,210$ g/ml e mobilidade alfa.

O metabolismo das lipoproteínas pode ser dividido em ciclo endógeno (lipídeos de origem endógena) e ciclo exógeno (lipídeos provenientes da dieta). O ciclo endógeno tem recebido mais atenção, principalmente, porque a associação entre dois de seus componentes, a LDL e a HDL, e a ocorrência de aterosclerose está bem documentada. Além disso, a avaliação da concentração de seus componentes é simples, verificando-se a medida de colesterol e triglicérides, após 12 horas de jejum. Ao contrário do ciclo endógeno, o metabolismo dos lipídeos exógenos é tão rápido que é difícil determinar alterações que possam ocorrer.

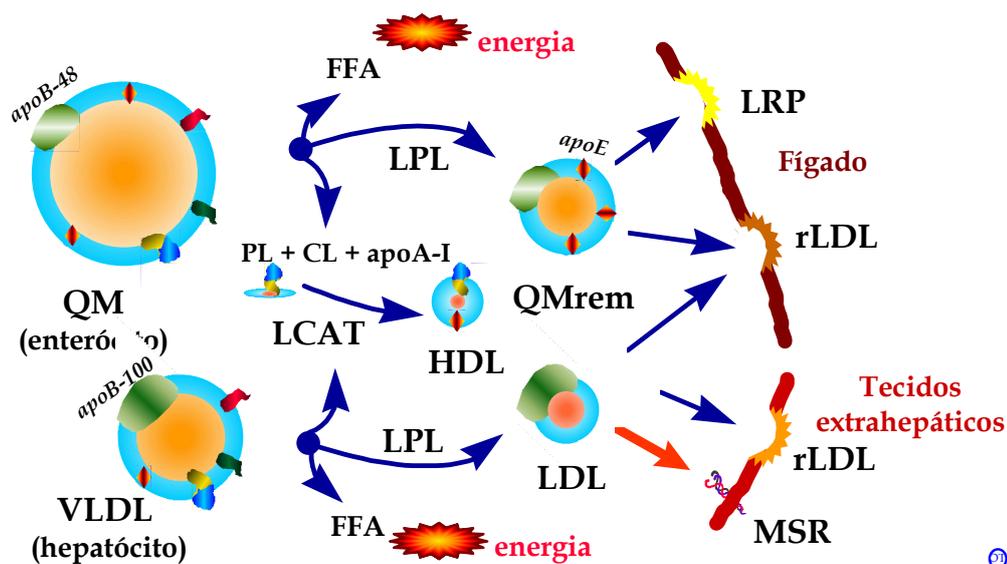


Figura 1. Metabolismo de Lipídeos. Os lipídeos de dieta são emulsificados no duodeno pelos sais biliares e sofrem a ação da lipase pancreática. Os lipídeos mais simples são então absorvidos passivamente pelos enterócitos. Nos enterócitos é sintetizado o **Quilomícron (QM)**, lipoproteína rica em triglicérides (TG) que contém a apoB-48 em sua estrutura. Uma vez secretados na linfa, os quilomícrons adquirem outras apolipoproteínas, principalmente apoA-I e apoE. Na circulação sistêmica os triglicérides são hidrolisados pela **lipase lipoprotéica (LPL)** e os **ácidos graxos (FFA)** liberados são utilizados para geração de energia. A partícula resultante, o **remanescente de quilomícron (QMrem)** é enriquecida em apoE no espaço de Disse e captada pelos receptores de LDL (**rLDL**) e pela proteína relacionada ao receptor de LDL (**LRP**) presentes no hepatócito. O fígado por sua vez sintetiza a **lipoproteína de densidade muito baixa (VLDL)** também rica em TG e que contém a apoB-100 como apolipoproteína estrutural. À semelhança do QM a VLDL sofre ação da LPL liberando FFA. A partícula resultante, a **lipoproteína de baixa densidade (LDL)** contém apoB-100 como proteína estrutural e é captada pelos rLDL presente no fígado e em outros tecidos. Parte da LDL sofre modificações oxidativas e é captada pelo **receptor de varredura (SR)** presente em macrófagos. Após perda de TG tanto o QM quanto a VLDL liberam **fosfolipídeos (PL)**, **colesterol** e **apoA-I** que se organizam em estruturas discóides que, após ação da enzima **lecitina-colesteril-acil transferase (LCAT)**, dão origem a **lipoproteína de alta densidade (HDL)**.

Como pode ser visualizado na figura 1, as duas vias metabólicas apresentam vários pontos em comum. Entretanto, por questão didática, vamos descrevê-las separadamente.

1.1. Ciclo exógeno

O ciclo exógeno inicia-se com a digestão dos lipídeos, provenientes da dieta, pelas lipases lingual e gástrica. Este processo é completado no intestino pela lipase pancreática. Os fosfolipídeos e o colesterol esterificado são hidrolisados no intestino

pela fosfolipase A2 e pelo colesterol esterase, respectivamente. A interação dos produtos lipolíticos com os ácidos biliares resulta na formação de micelas, o que favorece a aproximação e entrada desses lipídeos nas células da mucosa intestinal (LEVY, 1992).

Os produtos da digestão lipídica (monoglicerídeos, lisofosfatidilcolina e colesterol livre) destacam-se das micelas de sais biliares e cruzam a membrana da borda em escova da célula da mucosa intestinal por absorção passiva. O transporte até o retículo endoplasmático é mediado por uma proteína ligadora de ácido graxo (FABP). No retículo endoplasmático liso, (REL) os ácidos graxos, monoglicerídeos, colesterol livre e lisofosfatidilcolina são reesterificados, formando triglicérides, colesterol esterificado e fosfatidilcolina. Essas reações são catalisadas por enzimas específicas, localizadas na superfície citoplasmática da membrana do REL. Os lipídeos formados migram através das cisternas do REL até o retículo endoplasmático rugoso, aos quais são adicionadas as apoproteínas (B-48, A-I, A-II e A-IV), originando partículas que são transportadas ao complexo de Golgi para o processamento final.

As vesículas secretoras contendo os QM são, desse modo, transportadas até um sítio próximo à membrana lateral, do qual são secretadas para o espaço intercelular (REDGRAVE, 1983; LEVY, 1992). O número, o tamanho e a composição das partículas secretadas dependem do aporte e da natureza dos lipídeos absorvidos. Assim, durante o pico de absorção de lipídeos, há uma tendência à formação de partículas de tamanho maior (BISGAIER e col., 1983).

Os QM, liberados na linfa mesentérica, formam uma população heterogênea, com diâmetro variando de 75 a 600 nm que contêm a apoproteína B-48 como componente estrutural (REDGRAVE, 1983).

Após a secreção para os capilares linfáticos intestinais, os QM interagem com outras lipoproteínas presentes na linfa, principalmente a HDL (HAVEL, 1984; SCHAEFER e col., 1982). Como resultado, recebem as apoproteínas C, E e doam as apoproteínas A-I e A-IV, além de perder fosfolipídeos (TALL e col., 1982; BORENSZTAJN e col., 1988).

As apoproteínas predominantes nos QM são a apo A-I, C-I, C-II e C-III, com quantidades menores de apo E, A-IV e B-48. Essa última é sintetizada pelo intestino e constitui menos de 5% da proteína total na partícula (KANE e col., 1980). No entanto, desempenha papel na estruturação do QM, no seu transporte intracelular, na sua

liberação pela célula intestinal e permanece na partícula durante o seu transporte na linfa e no plasma (REDGRAVE, 1983).

Os QM são transportados para a circulação sistêmica através do ducto torácico. Os componentes da superfície continuam sendo trocados, principalmente, com a HDL. O metabolismo dos QM ocorre em duas etapas: a primeira é dependente da atividade da lipase lipoprotéica (LPL), enzima extra-hepática, responsável pela hidrólise dos triglicérides presentes no núcleo hidrofóbico dos QM e da VLDL (QUINN e col., 1982; ECKEL, 1989).

A LPL está presente em tecidos do tipo adiposo, muscular cardíaco e esquelético, pulmonar, glândula mamária, tanto em animais quanto em humanos (WION e col., 1987; KIRCHGESSNER e col., 1987; SENDA e col., 1987). A enzima é sintetizada nas células parenquimatosas, atravessa o espaço intersticial e liga-se aos glicosaminoglicanos da membrana basal de células endoteliais (CHENG e col., 1981). Existem, pelo menos, duas frações de LPL nos tecidos. A primeira é rapidamente liberada após perfusão com heparina e localiza-se na superfície luminal das células endoteliais. A segunda fração não é removida pela heparina, atuando como estoque de LPL (THOMPSON e col., 1993).

As taxas de síntese, deslocamento e degradação enzimática são fatores que influenciam a atividade da LPL, uma vez que a sua meia-vida é curta (ECKEL, 1989). Os níveis mais elevados de atividade enzimática são descritos em tecidos que oxidam e esterificam grandes quantidades de ácidos graxos como o músculo cardíaco e o tecido adiposo (CRYER, 1981). A enzima tem, portanto, papel fundamental no armazenamento lipídico no tecido adiposo e no fornecimento de energia para o músculo (LADU e col., 1991). A apo C-II, presente na superfície do QM e da VLDL, atua como co-fator da LPL, aumentando o índice de hidrólise de triglicérides. Após a ligação da LPL com a lipoproteína, ocorre uma hidrólise muito rápida no início, e os produtos liberados são utilizados pelas células (QUINN e col., 1982). À medida que a capacidade de utilização é ultrapassada, a hidrólise diminui porque o excesso dos produtos liberados bloqueia a ativação da enzima pela apo C-II. A diminuição da afinidade entre a enzima e a partícula de QM facilita o retorno da lipoproteína à circulação (CRYER, 1981). A apo C-III, também presente na superfície de QM e VLDL, inibe a atividade da LPL, atuando como modulador fisiológico dessa enzima (WANG e col., 1985).

A atividade da LPL, medida em extratos de tecidos, é regulada por estímulos bioquímicos (citocinas), farmacológicos (insulina) e fisiológicos (ácidos graxos) (MILLER

e col., 1984; BEUTLER E col., 1985; ZECHNER e col., 1988; SAXENA e col., 1989). Essa enzima é regulada de uma forma específica em cada tecido. Dessa forma, o jejum leva a uma redução na atividade da LPL no tecido adiposo e a um aumento desta atividade no músculo (BEUTLER e col., 1985; ZECHNER e col., 1988; SAXENA e col., 1989).

O catabolismo na circulação sanguínea é rápido, conferindo aos QM uma meia-vida plasmática curta (4 a 10 minutos) (COHEN, 1989). Durante a lipólise, o conteúdo de triglicérides da partícula diminui, mas o de colesterol esterificado não é alterado de forma significativa. Há perda de fosfolípidos, o que torna a superfície relativamente mais rica em colesterol livre. As apos associadas à partícula também são trocadas. Perde-se apo A-I e ganha-se apo C e E. As partículas resultantes apresentam um diâmetro menor (40 a 60 nm) e são denominadas remanescentes de QM (COHEN, 1989).

O processo lipolítico que resulta na geração dos remanescentes de QM é fundamental para a remoção da partícula pelos receptores hepáticos (REDGRAVE, 1983). Assim, o bloqueio da atividade da LPL leva ao acúmulo de QM na circulação, já que partículas não-metabolizadas têm baixa afinidade pelo receptor.

A ligação do QMrem ao receptor é feita através da interação com a apo E, que possui regiões ricas em aminoácidos básicos que constituem o domínio de reconhecimento pelos receptores de alta afinidade, localizados no espaço de Disse, o receptor B/E e a proteína relacionada ao receptor B/E, o LRP (figura 2). No espaço de Disse, lipase hepática (HL), localizada na superfície das células endoteliais dos sinusóides hepáticos, hidrolisa os fosfolípidos dos QMrem, o que facilita o enriquecimento da partícula com apo E (SHERRIL e col., 1980; MAHLEY e col., 1989, COOPER, 1997). Além das apos, tem sido questionado, também, o envolvimento das lipases (LPL e HL) na remoção dos QMrem pelos receptores hepáticos. SKOTTOVA e col (1995) demonstraram que a LPL tem uma participação na remoção hepática de remanescente de QM em hepatócitos de ratos que é independente de sua atividade catalítica. Estudos recentes demonstram que a HL pode atuar também como uma proteína de ligação para as partículas remanescentes (APPLEBAUM-BOWDEN, 1995). A presença de apo CII no QMrem exerce um efeito inibitório na remoção da partícula (SHELBURNE e col., 1980).

A remoção dos remanescentes de QM é importante na regulação dos níveis plasmáticos de colesterol. Existem evidências de que esta é a única lipoproteína capaz

de provocar uma potente inibição da síntese hepática de colesterol. Esse bloqueio é proporcional à quantidade de colesterol ingerida (ANDERSEN e col., 1979; TURLEY e col., 1981). Além disso, quando ocorre um aumento do colesterol proveniente dos QMrem no fígado, o número de receptores de LDL e a síntese de colesterol são reduzidos, afetando o balanço entre as várias classes de lipoproteínas (ANGELIN e col., 1983; BROWN e col., 1986). Essa diminuição da síntese hepática de colesterol e da expressão do receptor de LDL deve ocorrer devido à contribuição do receptor de LDL para captação hepática dos QMrem (COOPER, 1997).

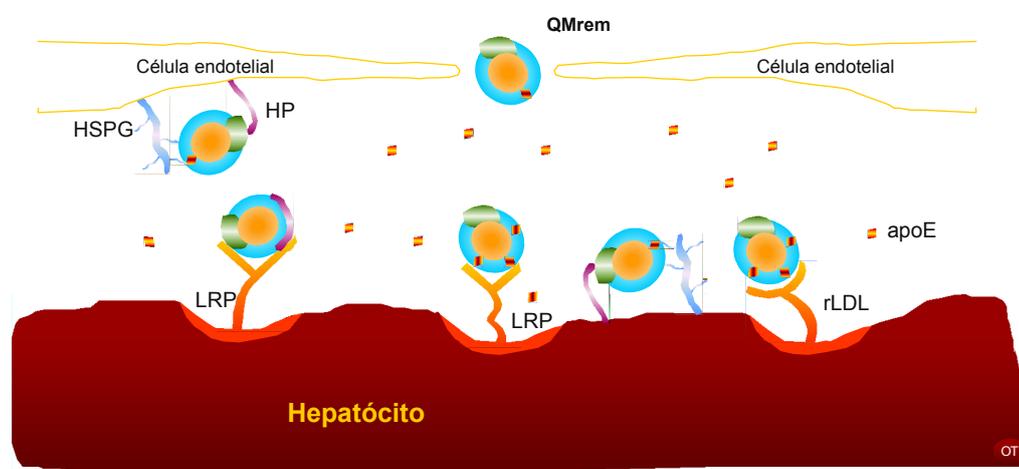


Figura 2 . Representação esquemática do espaço de Disse. Reproduzido de Cooper, 1997.

Após a captação hepática, os QMrem são catabolizados liberando ácidos graxos, glicerol, aminoácidos e colesterol. Esse último pode ser excretado na bile na forma de ácidos biliares, utilizado para a síntese de membranas ou integrar as lipoproteínas secretadas pelo hepatócito (HAVEEL e col., 1988).

O colesterol é secretado na bile, tanto na forma livre quanto na de ácidos biliares, e ambos são reabsorvidos no intestino. Na circulação entero-hepática, cerca de 50% do colesterol biliar e mais de 95% dos ácidos biliares são reabsorvidos. A maior parte do colesterol do organismo é excretada nas fezes (KESANIEMI e col., 1982).

1.2. Ciclo endógeno

O ciclo endógeno inicia-se com a formação de lipoproteínas ricas em triglicérides, como as lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), no hepatócito, tendo como proteína estrutural a apo B-100. A função principal da VLDL é o transporte

de triglicérides e de colesterol do fígado para os tecidos periféricos (EISENBERG e col., 1984).

Os ácidos graxos empregados na síntese de triglicérides, fosfolípídeos e na esterificação do colesterol no hepatócito são derivados da via glicolítica (síntese "de novo" de colesterol a partir de acetil-CoA), da captação de ácidos graxos livres por um processo passivo e da hidrólise intracelular dos remanescentes das lipoproteínas captadas pelo fígado (JANERO e col., 1984).

As VLDL têm diâmetro variando entre 0,94 e 1,006 g/ml, mobilidade pré-beta e são constituídas de: 45 a 65% de triglicérides, 15 a 20% de fosfolípídeos, 4 a 8% de colesterol e 6 a 10% de proteínas (Tabela 1). A VLDL é formada no retículo endoplasmático, contendo apoB-100, armazenada no complexo de Golgi e secretada para circulação (KANE e col, 1980; JANERO e col, 1984) e tem uma meia-vida plasmática de duas a quatro horas (EISENBERG, 1984). Na circulação, a partícula adquire as apos A, C e E, provenientes da HDL (BREWER e col, 1988; ERKELENS, 1989). Inicialmente a VLDL é convertida, progressivamente, em partículas mais densas, em consequência da hidrólise de triglicérides mediada pela LPL, de forma semelhante aos QM. O material em excesso da superfície, principalmente fosfolípídeos e colesterol, é utilizado para a síntese plasmática de HDL (DECKELBAUM e col., 1986). Os remanescentes de VLDL gerados recebem a denominação de lipoproteínas de densidade intermediária (IDL). Esta classe de lipoproteína tem densidade variando entre 1,006-1,019 g/ml e mobilidade pré-beta lenta. Uma fração da IDL plasmática é removida rapidamente pelo fígado, principal sítio de catabolismo das lipoproteínas que contêm apo B. A remoção ocorre pela ligação de alta afinidade, tanto pelo receptor LRP quanto pelo receptor B/E (rLDL) (ARBEENY e col., 1984; BROWN e col., 1986; GREGG e col., 1988). A IDL não removida pelo fígado sofre lipólise adicional, o que acarreta alterações de composição, com perdas de todas as apos, exceto da apo B-100, e das propriedades físicas da lipoproteína que passa a ser denominada lipoproteína de baixa densidade (LDL) (HAVEEL, 1984).

Em indivíduos normais, a LDL carrega cerca de 2/3 do colesterol plasmático total. A LDL tem uma meia-vida de 4 a 5 dias, e sua, metabolização ocorre através da interação com o receptor B/E (rLDL), no fígado e em tecidos extra-hepáticos (Figura 1). O colesterol fornecido pela LDL para os tecidos extra-hepáticos é utilizado na síntese de hormônios esteróides na córtex adrenal e gônadas, na síntese de membranas e na síntese de VLDL no fígado (BROWN e col., 1986). Os rLDL estão localizados em

regiões diferenciadas da membrana citoplasmática, denominadas depressões cobertas (coated pits) (GOLDSTEIN e col., 1979). Essas regiões são cobertas pela proteína de sustentação do citoesqueleto, chamada clatrina. Após a ligação lipoproteína-receptor, essa região sofre invaginação rápida (endocitose) formando a vesícula endocítica. O envoltório de clatrina se dissocia, e várias vesículas se fundem formando os endossomos. A diminuição do pH nesses endossomos promove o desligamento do complexo receptor-LDL, com retorno do receptor à superfície celular. Seguem-se a fusão com lisossomos e a degradação dos seus componentes, as apolipoproteínas a aminoácidos livres, colesterol esterificado a colesterol livre, triglicérides a ácidos graxos. O colesterol livre que entra no compartimento citoplasmático pode ser utilizado no metabolismo celular ou ser armazenado após reesterificação pela enzima acil CoA:colesterol aciltransferase (ACAT) (BROWN e col.,1981). O colesterol oriundo do catabolismo da LDL determina três eventos intracelulares de natureza regulatória:

1. inibição da sua biossíntese por diminuição da expressão da enzima 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A redutase (HMGCoA redutase) enzima chave na síntese endógena do colesterol;
2. estimulação da atividade da colesterol acil transferase (ACAT), com conseqüente aumento da esterificação do colesterol e armazenamento do excesso de colesterol em gotículas lipídicas;
3. diminuição da síntese do rLDL reduzindo a captação da lipoproteína.

Em situações em que possa ocorrer diminuição ou ausência de remoção de LDL pelos rLDL, a lipoproteína tende a se acumular no plasma, podendo sofrer modificações dos seus componentes lipídicos ou protéico. A partícula passa a ser reconhecida por um outro tipo de receptor, denominado receptor de varredura ou "scavenger" (SR), presente em células do sistema retículo endotelial como macrófagos. Quando esses macrófagos tornam-se sobrecarregados com colesterol esterificado, convertem-se nas células espumosas, componente clássico do processo de aterogênese. Estima-se que 33 a 66% da LDL plasmática é degradada via rLDL e o restante pela via SR ou por outros mecanismos ainda não conhecidos (BROWN e col.,1990).

3. Linfomas

Os Linfomas são neoplasias malignas do sistema linforeticular (linfócitos ou histiócitos). Geralmente iniciam-se nos gânglios ou nódulos linfáticos sendo, denominados de ganglionares ou linfonodais e, mais raramente, iniciam-se nos tecidos linfóides não ganglionares como no trato gastrointestinal, ossos, testículos, cérebro, dentre outros, sendo chamados de extranodais. Os linfomas podem ser divididos em dois grandes grupos: linfoma ou doença de Hodgkin (LH) e linfoma não Hodgkin (LNH). A etiologia dos mesmos é desconhecida, no entanto, um significativo progresso tem sido obtido nas duas últimas décadas. A hipótese mais aceita, em alguns casos, está relacionada a uma etiologia viral associada a uma resposta imunológica atípica. Fatores como anormalidades citogenéticas, eventos genéticos moleculares, viroses, supressão imune, oncogenes, reguladores de transcrição e o ciclo celular estão implicados na patogênese dos linfomas. Algumas patologias parecem associadas ao risco de desenvolvimento de linfoma, dentre elas temos a AIDS, imunodeficiência congênita, lupus eritematoso sistêmico, artrite reumatóide, dentre outras (ROSENBERG, 1989; GALLAGHER e col., 1986; EZDINILE e col., 1985).

O estadiamento nos linfomas consiste na avaliação da extensão da doença no sítio primário, na pesquisa de metástase regionais ou à distância. O estadiamento, além de fornecer dados sobre a massa tumoral permite, informações como: planejamento terapêutico; prognóstico da doença; eficácia do tratamento realizado e orientação na busca de novos conhecimentos sobre tumores. O sistema de estadiamento não deve ser considerado definitivo. Há dois tipos básicos de estadiamento, o clínico e o patológico. O estadiamento clínico é baseado em exame físico, dosagens bioquímicas e exames de imagem, como o estudo radiológico, ultra-sonografia, cintilografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética e procedimentos endoscópicos. Nos linfomas, o sistema de estadiamento utilizado é a classificação de Ann Arbor (CARBONE e col, 1971), que é baseada na tendência dessas neoplasias em comprometer grupos de linfonodos contíguos. Nessa classificação os estádios levam em consideração a localização dos tumores e a presença de sintomas constitucionais (febre, perda de peso ou sudorese). Esse sistema tem grande importância em relação ao planejamento terapêutico e prognóstico, principalmente, nos pacientes com LH.

3.1. Doença de Hodgkin

O linfoma de Hodgkin (LH) é uma doença proliferativa dos tecidos linfóides, que se apresenta clinicamente com adenomegalia, quadro febril crônico e emagrecimento progressivo. O LH é caracterizado por uma infiltração celular pleomórfica dos gânglios com células gigantes multinucleadas, denominadas de células de Reed-Sternberg. Em 1966, Rosenberg propôs um sistema de estadiamento para o LH. No mesmo ano, LUKES e col., propuseram uma classificação associando os aspectos clínicos com o prognóstico. A classificação foi modificada em um simpósio em Rye, Nova York, e posteriormente denominada de classificação de Rye(LUKES e col, 1966b), que continua em uso até hoje. A classificação define quatro subtipos histopatológicos: predominância linfocitária (PL), esclerose nodular (EN), celularidade mista (CM) e depleção linfocitária (DL)

3.2. Linfoma não Hodgkin

Os LNH constituem proliferações clonais de apenas um tipo celular: linfócitos T, linfócitos B ou de células reticulares, com predomínio da linhagem B, os quais ocorrem nos órgãos linfóides, podendo invadir a medula óssea e o sangue periférico e, nestas situações, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com algumas leucemias linfóides (GROGAN e col., 1988). Frequentemente, estão relacionados com alterações citogenéticas que resultam na perda de controle do ciclo celular. Há várias classificações dos LNH. A classificação de Rappaport (1956) é a mais simples e baseia-se no tipo celular, grau de diferenciação celular e padrão histológico do gânglio(nodular ou difuso) Posteriormente, com o avanço da clínica e das características imunológicas das células envolvidas, as classificações se tornaram complexas(DORFMAN, 1974; BENNETT e col., 1974; GÉRARD-MARCHANT e col., 1974 LENNET e col., 1975; LUKES & COLLINS, 1975;). A primeira classificação de Kiel(1978) foi revista por patologistas americanos que publicaram, em 1982, a Formulação Internacional, a classificação internacional (Working Formulation).

Em 1988, o grupo de Kiel publicou uma simplificação da classificação inicial, separando os linfomas tipo B dos linfomas T, adotando o critério de baixa e de alta malignidade. Em 1994, um grupo de patologistas europeus e americanos revisaram a classificação dos linfomas B e T e propuseram nova classificação denominada REAL(Revised European-American Classification of Lymphoma (REAL), baseada na

divisão dos linfomas em dois grandes grupos, de acordo com a linhagem celular predominante.

Os LNH incidem em todas as idades e, geralmente, apresentam-se com uma gama ampla de tipos histológicos. Surgem como massas indolores nas cadeias linfonodais das axilas, retroperitônio, fossas supra-claviculares, etc. O exame clínico, facilmente, detecta gânglios superficiais acometidos. Pacientes portadores de LNH podem apresentar hepatomegalia, causada pela infiltração difusa ou nodular do fígado, ou esplenomegalia. Cadeias profundas afetadas causam sintomas relativos à sua posição. Por exemplo, o aumento dos linfonodos mediastinais pode levar à obstrução da veia cava superior em paciente com doença avançada (ROSENBERG, 1989; GALLAGHER e col., 1986; EZDINILE e col., 1985).

O diagnóstico diferencial dos linfomas com outras patologias tornou-se possível graças à produção, em larga escala, de anticorpos monoclonais (AcMo) dirigidos contra os antígenos de superfície leucocitária. A associação do uso de anticorpos monoclonais com o da citometria de fluxo e o aperfeiçoamento dos métodos de coloração imunocitológica proporcionaram uma melhor caracterização imunofenotípica das células hematopoéticas normais. O sistema internacional de nomenclatura CD - "cluster determinants"- foi criado no Primeiro Seminário sobre os Antígenos de Diferenciação Leucocitária. Essa denominação passou a ser utilizada para definir grupos de anticorpos que apresentam o mesmo padrão de reatividade e que reconhecem a mesma molécula (CLARK e col., 1989).

Após o diagnóstico e o estadiamento do linfoma, é estabelecido o plano terapêutico. Os linfomas são tratados seguindo regras estabelecidas internacionalmente. Dentre as modalidades de tratamento temos a radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e outras. Nos linfomas não-Hodgkin de histologia favorável, o esquema de escolha é o COP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona), já nos de histologia desfavorável, o esquema de escolha é o CHOP (ciclofosfamida, vincristina, prednisona e doxorubicina). Na doença de Hodgkin, o esquema de escolha é o MOPP (mostarda nitrogenada, ciclofosfamida, vincristina, procarbazina e prednisona). Além do MOPP, há esquemas chamados alternativos para o tratamento de casos que não se beneficiaram com a terapia anterior como o esquema ABV (doxorubicina, bleomicina, vimblastina). Os quimioterápicos antineoplásicos atuam em nível celular, impedindo a divisão e interferindo no processo de crescimento e diferenciação. Essa interferência ocorre tanto nas células normais quanto nas células

transformadas. A sensibilidade das células tumorais aos quimioterápicos é variável, podendo induzir remissão completa com o desaparecimento de toda a massa tumoral. A radioterapia é o tratamento através de radiação ionizante (eletromagnética e corpuscular) recomendada nos casos, em que o tumor é localizado.

4. Metabolismo de quilomícrons e neoplasias

A presença e o crescimento de uma neoplasia maligna causam alterações metabólicas importantes no organismo hospedeiro. Estudos experimentais em ratos demonstram que essas alterações ocorrem mesmo com tumores pequenos e se acentuam à medida que a massa tumoral aumenta. A diminuição do colesterol plasmático, às custas da redução do colesterol da LDL, já está bem estudada em humanos e se deve ao aumento da expressão do rLDL pelo tecido neoplásico. A síndrome consumptiva é um efeito universalmente descrito em animais e seres humanos portadores de neoplasias. Essa síndrome inclui uma depleção lipídica que não é explicada somente pela diminuição da ingesta calórica, uma vez que a suplementação alimentar não evita a perda dos estoques de gordura (AXELROD e col., 1980; BURT e col., 1982; McANDREW, 1986; LEGASPI e col., 1987). A hipertrigliceridemia, observada em pacientes portadores de leucemia e linfoma, tem sido atribuída a um aumento de VLDL, decorrente de um defeito no clareamento plasmático da lipoproteína (SPIEGEL, 1982). Estudos em animais sugerem que tanto a diminuição da atividade da LPL na superfície endotelial quanto o aumento da atividade lipolítica no tecido adiposo podem estar presentes e contribuir para os achados descritos acima. Os mecanismos envolvidos nessas alterações no metabolismo lipídico associadas às neoplasias, ainda são objeto de estudo. Os substratos podem estar sendo desviados do circuito metabólico normal para o tumor, uma via que requer energia. A depleção lipídica pode ser resultado, então, de uma menor captação dos lipídeos circulantes, de um aumento na mobilização dos lipídeos já estocados ou da combinação destes dois mecanismos. Fatores produzidos pelo tumor podem inibir a atividade e a síntese de enzimas lipogênicas (LPL, por exemplo), fundamentais para o aproveitamento dos lipídeos provenientes da dieta (THOMPSON e col., 1981; LANZA-JACOBY e col., 1984; McANDREW, 1986; YOUNES e col., 1990). Vários estudos experimentais, em animais, têm sido feitos com o intuito de identificar os mecanismos básicos envolvidos na depleção lipídica associada a neoplasias (REDGRAVE e col., 1984; LANZA-JACOBY e col., 1984; BABAYAN e col., 1984). Esses modelos animais podem não representar fielmente o que ocorre em seres humanos com tumor, mas os

resultados são bastante congruentes com os obtidos na pesquisa clínica (THOMPSON e col., 1993). Uma das primeiras alterações descritas é a diminuição da atividade da LPL, o que explicaria o menor aproveitamento dos lipídeos provenientes da dieta, já que essa enzima é fundamental para a assimilação pelos tecidos das lipoproteínas ricas em TG. A atividade e a expressão da LPL no tecido adiposo estão diminuídas em animais com tumor (LANZA-JACOBY e col., 1984). Alguns fatores humorais, produzidos pelo tumor ou em consequência da sua presença, têm sido implicados na diminuição da atividade da LPL. Tais fatores incluem hormônios catabólicos e citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 1 (IL-1) (ONG e col., 1988; THOMPSON e col., 1993). Em culturas de adipócitos de pacientes com neoplasia, a mobilização dos lipídeos é consequente a um aumento na atividade da lipase sensível a hormônio (HSL) (THOMPSON e col., 1993).

5. Metodologia para estudo do metabolismo dos QM

A maioria dos estudos sobre o metabolismo dos QM tem sido realizada em modelos experimentais com animais, utilizando métodos extremamente laboriosos. Esses envolvem a marcação isotópica de lipídeos administrados por sonda gástrica ou duodenal, a obtenção da linfa por cateterização do ducto torácico e o isolamento dos QM por ultracentrifugação (ZILVERSMIT, 1950; BERGMAN e col., 1971, SHERRIL e col., 1980). Os QM naturais obtidos desta forma podem ser injetados num outro animal para avaliar o seu metabolismo.

O estudo do metabolismo de QM em seres humanos através da injeção endovenosa de QM naturais foi descrito, na década de 60, por Nestel e col (1964). Os QM naturais eram colhidos do ducto torácico após uma refeição rica em gordura, contendo ^3H -ácido palmítico. O uso desse método é limitado por razões práticas e evidentes.

Uma alternativa proposta é a avaliação da remoção plasmática dos QM por métodos indiretos, como o teste de tolerância oral à gordura. Esse teste baseia-se na suposição de que a magnitude da hipertrigliceridemia que ocorre após uma refeição rica em gordura, está inversamente relacionada à taxa de remoção dos triglicérides dos QM (NESTEL, 1964). Entretanto, fatores como a taxa de absorção de triglicérides, seu influxo na circulação, a produção endógena de triglicérides e a taxa de formação dos QM influem na lipemia pós-prandial, não permitindo a quantificação da remoção dos QM.

Uma segunda alternativa é o método baseado na perfusão duodenal de gordura (GRUNDY e col.,1976). A metodologia calcula a taxa de remoção dos triglicérides dos QM, a partir de sua concentração plasmática em equilíbrio dinâmico (“steady state”). Essa condição é obtida através da perfusão duodenal de uma emulsão gordurosa numa velocidade constante. No estado de equilíbrio, a taxa de entrada de QM no plasma é igual ao influxo de triglicérides perfundidos no duodeno. Esse método requer um tempo prolongado para sua execução e gera desconforto para o indivíduo estudado.

A ingestão de vitamina A (éster de retinol) marcada radioativamente tem sido descrita como método para estudar o metabolismo de QM em seres humanos. O retinol, assim como o colesterol, é esterificado na mucosa intestinal com ácidos graxos de cadeia longa (por exemplo, o ácido palmítico) e secretado na linfa dentro do núcleo hidrofóbico dos QM, servindo como marcador da lipoproteína. A determinação da concentração plasmática de palmitato de retinol durante o período pós-prandial reflete o aparecimento e desaparecimento plasmáticos dos QM e seus remanescentes (HAZZARD e col., 1976; BERR e col.,1984; BERR, 1992; OOI e col., 1992). Entretanto, a execução desse teste é lenta e trabalhosa, o que dificulta a sua aplicação rotineira.

REDGRAVE & MARANHÃO (1985) desenvolveram emulsões lipídicas artificiais, com tamanho, densidade e composição química semelhantes às dos QM. Essas emulsões não contêm proteínas, mas, quando injetadas na circulação, adquirem as diversas após através da troca de componentes de superfície com as lipoproteínas plasmáticas. Estudos feitos, após a injeção plasmática destas emulsões em ratos, demonstraram que o seu comportamento metabólico é semelhante ao dos QM naturais (REDGRAVE e col.,1985; MARANHÃO e col.,1986; REDGRAVE, e col.,1993). Essa metodologia apresenta a vantagem de ultrapassar as etapas de absorção intestinal dos lipídeos e da formação dos QM, além da grande facilidade na realização do teste e da possibilidade de acompanhar o metabolismo dos QM através da utilização de dois isótopos radioativos (^{14}C -EC e ^3H -TG). Estudos realizados, posteriormente, em animais e em seres humanos, demonstram que o uso dessas emulsões artificiais pode fornecer dados sobre o metabolismo dos QM em diversas situações, como regimes dietéticos e em diferentes patologias (OLIVEIRA e col., 1988; MARANHÃO e col., 1986; NAKANDAKARE e col., 1994; MARANHÃO e col., 1996).

O grupo do Maranhão vem trabalhando com o QM artificial em diferentes patologias seja hematológica ou não e obtendo resultados muito interessantes (Sakashita, 1995, Hungria,1997).

OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o metabolismo dos quilomícrons em pacientes portadores de doença de Hodgkin e de linfomas não Hodgkin, com o intuito de identificar e localizar defeitos no circuito metabólico dos quilomícrons associados aos linfomas.

CASUÍSTICA, MATERIAIS e MÉTODOS

1. Casuística

O recrutamento foi realizado no período de agosto de 1996 a julho de 1997, entre os pacientes portadores de linfoma não-Hodgkin (LNH) e doença de Hodgkin (LH), atendidos no ambulatório de Hematologia e Hemoterapia da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. O grupo controle foi selecionado no Instituto do Coração (InCor) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Foram excluídos do estudo os pacientes com sorologia positiva para HIV e HTLV-I e II e os diabéticos. Participaram do estudo um total de 30 pacientes, destes 19 para o grupo LNH e 11 para o LH. No grupo LNH, 11 dos pacientes eram do sexo masculino, com idade variando de 21 a 80 anos (média= 54 ± 17 anos); no grupo LH, 6 eram do sexo masculino, com idade variando de 17 a 67 anos (média= 35 ± 16 anos). O grupo controle foi constituído por 12 indivíduos, sendo 7 do sexo masculino com idade variando de 20 a 64 anos (média= 43 ± 14 anos). O índice de massa corpórea (IMC) do grupo LNH apresentou uma média= $23,0 \pm 3,9$ kg/m², o grupo LH média de $20,3 \pm 3,0$ kg/m² e no grupo controle de $25,5 \pm 3,8$ kg/m² (Tabelas 8,9 e 10).

Tabela 1. Características do grupo LNH.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)
----------	------	--------------	-----------	------------	--------------------------

1	F	80	55	1,62	21,0
2	M	69	48	1,54	20,2
3	F	50	58	1,59	22,9
4	F	45	44	1,52	19,0
5	F	44	44	1,56	18,1
6	M	78	58	1,62	22,1
7	M	60	78	1,64	29,0
8	M	54	63	1,64	23,4
9	F	62	54	1,56	22,2
10	M	36	63	1,62	22,2
11	M	61	56	1,64	20,8
12	M	53	72	1,68	25,5
13	F	74	48	1,56	19,7
14	F	67	86	1,61	33,2
15	M	21	74	1,74	24,3
16	M	66	68	1,61	26,2
17	F	25	42	1,56	17,3
18	M	39	73	1,72	24,7
19	M	46	76	1,70	26,3
Média±SD	-	54±17	61,0±12,9	1,61±0,06	23,0±3,9

Tabela 2. Características do grupo LH.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)
1	F	29	68	1,64	25,3
2	M	54	56	1,63	21,1
3	F	67	45	1,62	17,2
4	M	50	68	1,72	22,9
5	M	17	64,5	1,75	21,1
6	F	27	41,3	1,64	15,4
7	F	26	53	1,56	21,8
8	F	42	48	1,62	18,3
9	M	33	52	1,6	20,3
10	M	26	63	1,64	23,4
11	F	19	44	1,6	17,2
Média ± SD	-	35±16	54,8±9,8	1,63±0,05	20,3±3,0

Tabela 3. Características grupo controle.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Peso (Kg)	Altura (m)	IMC (kg/m ²)
1	F	20	60	1,72	20,3
2	F	20	55	1,62	20,9
3	M	54	72,5	1,62	27,6
4	M	39	91,5	1,75	29,9
5	M	55	72,5	1,59	28,7
6	F	64	70,9	1,79	22,1
7	F	42	82	1,69	28,7
8	M	55	80,7	1,70	27,9
9	M	46	81,4	1,67	29,2
10	M	35	67,2	1,55	28
11	M	43	52,3	1,58	21
12	F	52	64,3	1,69	22,5
Média ± SD	-	43±14	70,8±11,8	1,66±0,07	25,5±3,8

Os trinta pacientes com linfoma foram diagnosticados, segundo os critérios estabelecidos para LNH e LH já descritos na introdução. Para caracterização da linhagem celular envolvida no clone linfomatoso, foi realizado o estudo de material ganglionar por método imuno-histoquímico nos pacientes portadores de LNH. Dentre os

anticorpos monoclonais (AcMo) foram utilizados: CD2, CD3, CD7 (dirigidos contra antígenos de superfície da linhagem T) e CD15, CD20, CD22 (dirigidos contra antígenos de superfície B); imunoglobulinas de membranas e/ou citoplasma (linhagem B); CD30 ou anticorpo Ki-1 considerado marcador das células de Reed-Sternberg, podendo reagir com algumas células T ativadas, com células B infectadas com vírus EB (EBV) e com células dos linfomas imunoblásticos e o CD45ro (UCHL1). Todos os pacientes apresentavam-se em intervalo de tratamento oncológico (radioterapia ou quimioterapia) quando foram submetidos ao estudo. Dos 19 pacientes com LNH, 1 encontrava-se no estágio IA, 3 no estágio II (1A e 2B), 6 no estágio III (1A e 5B) e 9 no estágio IV (1A e 8B). Dos 11 pacientes com LH, 1 encontrava-se no estágio IA, 4 no estágio II (1A e 3B), 2 no estágio IIIB e 4 no estágio IVB. Os parâmetros hematológicos e os dados bioquímicos dos pacientes (média \pm SD) estão resumidos nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 4: Perfil hematológico dos pacientes com LH participantes do protocolo. Os valores representam a média \pm SD.

Parâmetros	Grupo		
	LNH (n=19)	Controle (n=12)	LH (n=11)
Hemácias/ μ l ($\times 10^{-6}$)	4,31 \pm 0,72	4,617 \pm 0,0296	4,15 \pm 0,50
Hemoglobina (g/dl)	12,5 \pm 2,31	13,88 \pm 0,897	11,4 \pm 1,51
Hematócrito (%)	38,0 \pm 6,55	41,28 \pm 2,56	34,6 \pm 4,58
VCM (fl)	88,0 \pm 5,41	89,2 \pm 1,27	83,4 \pm 3,61
HCM (pg)	28,8 \pm 2,03	29,97 \pm 0,33	27,5 \pm 1,44
CHCM (g/dl)	32,7 \pm 0,83	33,6 \pm 0,602	32,9 \pm 0,58
Leucócitos/ μ l ($\times 10^{-3}$)	5,7 \pm 2,95	7,08 \pm 2,04	5,8 \pm 4,14
Neutrófilos (%)	62,2 \pm 16,9	52,77 \pm 7,14	59,2 \pm 22,1
Bastões (%)	4,63 \pm 6,6	0,57 \pm 0,786	2,72 \pm 2,86
Segmentados (%)	57,5 \pm 15,9	52,2 \pm 6,85	56,5 \pm 21,8
Eosinófilos (%)	3,15 \pm 3,16	3,15 \pm 1,82	5,85 \pm 15,0
Basófilos (%)	0,66 \pm 0,71	0,15 \pm 0,23	1,79 \pm 4,24
Linfócitos (%)	25,6 \pm 16,6	38,57 \pm 5,91	22,2 \pm 12,6
Linfócitos atípicos (%)	0	0	0
Monócitos (%)	7,2 \pm 5,03	5,34 \pm 1,75	10,0 \pm 8,18
Plaquetas/ μ l ($\times 10^{-3}$)	237,0 \pm 122,3	246,7 \pm 46,54	279,1 \pm 191,2

Abreviaturas: VCM: volume corpuscular médio; HCM: hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular média,

Tabela 5: Determinações bioquímicas realizadas nos pacientes. Os valores representam a média±SD.

Parâmetros	Referência	GRUPOS	
		LNH (N=19)	LH (N=11)
Mucoproteínas (mg/100ml)	até 4,0	3,5±1,78	3,56±2,56
γ-GT (U/l)	12,5 - 58,3	103,84±186,0	47,09±39,37
Fosfatase Alcalina (mU/ml)	37 - 147	150,15±87,7	187,8±126,4
β ₂ -Microglobulina (mg/l)	0,7 - 3,4	2,16±0,911	1,91±0,915
Proteínas totais (g/100ml)	6,0 - 8,0	7,40±1,03	7,26±0,60
Albumina (g/100ml)	3,0 - 5,0	3,93±0,82	4,01±1,00
DHL (U/l)	150 - 360	653,6±1028,8	348,3±118,5
Bilirrubina Total (mg/100ml)	até 1,0	0,77±0,40	0,90±0,88
Bilirrubina direta (mg/100ml)	até 0,2	0,25±0,22	0,50±0,68
Bilirrubina indireta (mg/100ml)	até 0,8	0,71±0,83	0,40±0,29
Úreia (mg/100ml)	10 - 50	27,6±8,69	27,4±12,1
Creatinina (mg/100ml)	0,7 - 1,5	1,04±0,27	0,99±0,16
Glicemia (mg/100ml)	70 - 110	95,89±13,14	88,63±11,15
TGO (U/l)	12 - 46	38,8±56,9	28,45±16,75
TGP (U/l)	3 - 50	30,10±39,6	25,81±17,12

Abreviaturas: DHL = Desidrogenase láctica; TGO = Aspartato aminotransferase; TGP = Alanina aminotransferase.

2. Materiais

Os lipídeos puros, trioleína, oleato de colesterol e fosfatidilcolina, utilizados na produção das emulsões foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St Louis, EUA). O oleato de colesterol-[1-¹⁴C] (¹⁴C-CE) (S=2,07 GBq/mmol) e o tri-[9,10 (n)-3H] oleato de glicerol (³H-TG) (S=518 Gbq/mmol) foram obtidos da Amersham International (Inglaterra). A técnica de cromatografia em camada delgada (0,5 mm de espessura), utilizando sílica gel 60 H e sistema solventes hexano:éter etílico:ácido acético (70:30:1, v/v), foi empregada para verificar a pureza dos lipídeos. Os demais reativos e solventes foram adquiridos da Merck-Quimitra (Rio de Janeiro, RJ) e da Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA). Toda a vidraria utilizada nesse experimento foi submetida à esterilização a seco (estufa a 180°C, por 1 h e 30 min) e a vapor (autoclavagem a 120°C, 1 atm, 20 min). O material plástico e de borracha foi submetido à esterilização por exposição à luz ultravioleta. Todo esse procedimento foi realizado pelo Setor de Esterilização do Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (InCor), visando garantir a injeção, nos participantes, de preparação estéril e apirogênica.

3. Métodos

3.1. Avaliação do índice de massa corpórea

A avaliação da constituição individual foi realizada pelo cálculo do índice de massa corporal (IMC) ou Índice de Quetelet. A classificação segundo os valores de IMC foi feita de acordo com a proposta por James, 1988 (Tabela 16).

Tabela 6. Constituição física de acordo com o índice de massa corpórea.

Classificação	IMC (kg/m ²)
Baixo peso	< 17
Normal	17 – 25
Sobrepeso	25 – 30
Obesidade	30 – 40
Obesidade mórbida	> 40

Fonte: JAMES (1988), IMC = índice de massa corpórea

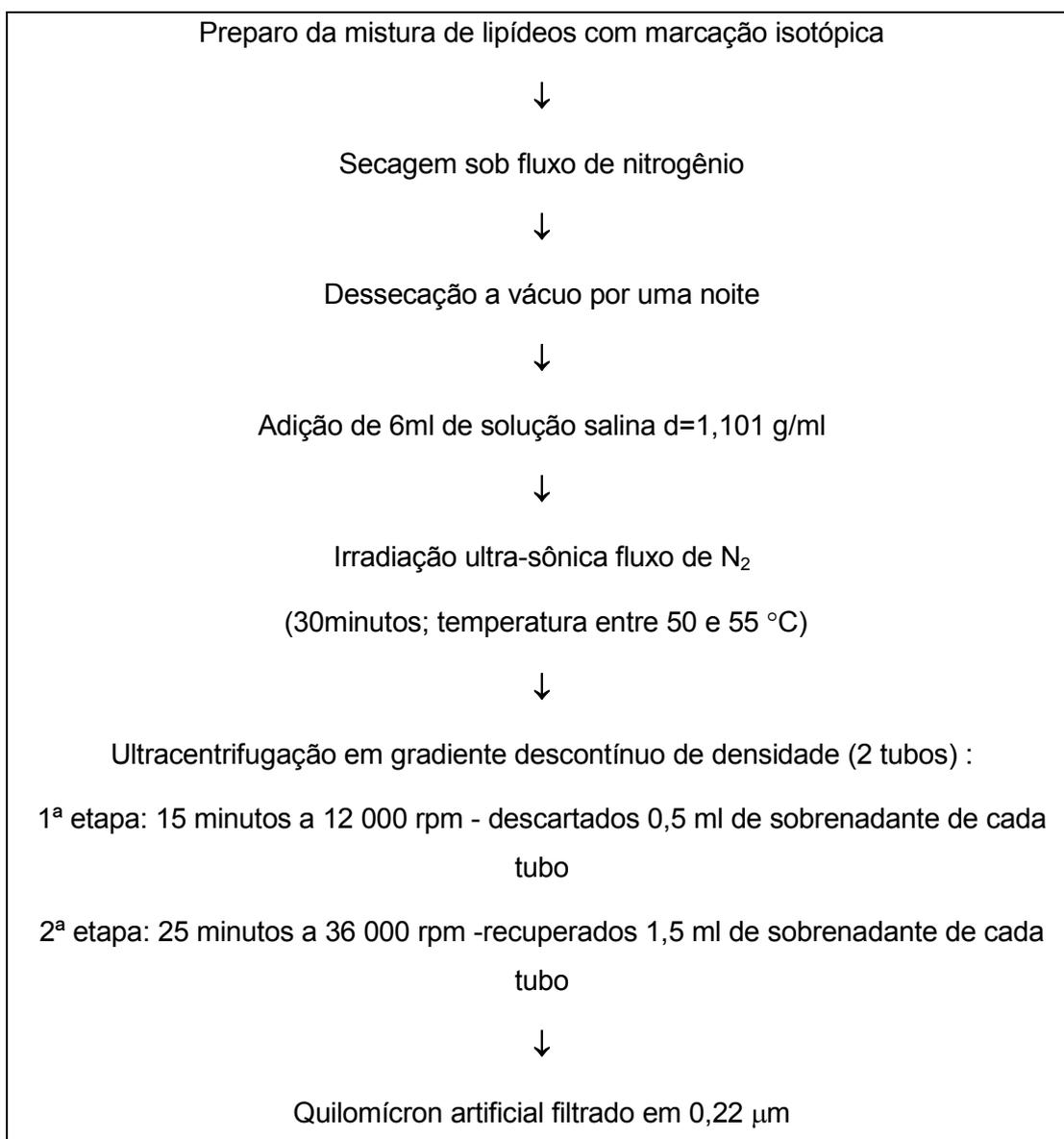
3.2. Estudo do sangue periférico

A contagem de hemácias, dosagem de hemoglobina, determinação do hematócrito, dos índices hematimétricos (VCM, HCM, CHCM e RDW), contagem dos leucócitos com diferencial e contagem de plaquetas foram realizadas por métodos automatizado (CELL DYN 3000 CS da Abbott, Chicago, EUA), em amostras de sangue periférico colhido na presença de EDTA.

3.3. Preparação da emulsão

A emulsão foi produzida utilizando-se uma mistura de 69 mg de trioleína, 2 mg de CL, 6 mg de oleato de colesterol e 23 mg de fosfatidilcolina, a partir de soluções-estoque preparadas em clorofórmio/metanol (2:1). A essa mistura foram adicionados [^{14}C]colesterol-oleato (^{14}C -CE) e [^3H] trioleato de glicerol (^3H -TG). O solvente foi, então, evaporado sob fluxo de nitrogênio, seguindo-se dessecação a vácuo a 4°C, durante 12 horas para garantir a eliminação de resíduos de solventes. Os lipídeos livres dos solventes foram ressuspensos em 6 ml de solução de NaCl 2,785 M, e a suspensão foi submetida à irradiação ultra-sônica (Branson Cell disrupter, modelo B-30, Arruda-Ultrasons, São Paulo, SP), por 30 minutos, sob atmosfera de nitrogênio, temperatura de 50 a 60°C, com potência de 70-80 watts em modo de operação contínuo. Para a obtenção dos quilomícrons artificiais na faixa de diâmetro desejado, a solução lipídica foi purificada em duas etapas de ultracentrifugação (ultracentrifuga Beckman L80, rotor SW-41) em gradiente descontínuo de densidade. Após a primeira etapa (12.000 rpm por 15 minutos a 22°C), 1 ml da camada superior do tubo foi removida e desprezada, sendo substituída por solução salina de 1,006 g/ml de densidade. Após a segunda ultracentrifugação (36.000 rpm por 25 minutos a 22°C), a emulsão (aproximadamente 1,5 ml do topo do tubo) foi removida, submetida à filtração em filtro de 0,2 μm (Millex, Millipore), conservada à temperatura ambiente e utilizada dentro de 15 dias do preparo.

O esquema abaixo resume os procedimentos de preparo dessa emulsão.



3.4. Análise dos constituintes da emulsão

A trioleína foi determinada por método enzimático comercial (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) e os fosfolípidos, pelo método de Zilversmit (1950). A separação de colesterol livre do esterificado foi feita em cromatografia de camada delgada (0,5 mm de espessura), utilizando sílica gel 60 H e sistema solvente hexano/éter etílico/ácido acético (70:30:1, vol/vol). O colesterol livre e o oleato de colesterol foram quantificados pelo método de ZLATKIS e col.(1969).

3.5. Protocolo experimental

Os estudos da cinética plasmática foram feitos, a partir das 8:00 horas, com os participantes do estudo, em jejum de 12 horas. Os pacientes foram submetidos à cateterização de veia periférica mantida com soro fisiológico. Após a coleta da amostra basal de sangue para análise de CT, TG, HDL-C, LDL-C, VLDL-C, ApoA1, ApoB, Lp(a), TNF- α e INF- γ , os indivíduos receberam a injeção endovenosa da emulsão contendo 74 kBq (2 mCi) de ^{14}C -CE e 148 kBq (2 mCi) de ^3H -TG. As amostras de sangue (8ml) foram coletadas por um acesso venoso diferente, em tubos, contendo heparina (50 UI/ml de sangue), em intervalos regulares: 2, 4, 6, 10, 15, 20, 30, 45 e 60 minutos. O sangue foi centrifugado durante 10 minutos a 2 500 rpm, em centrífuga refrigerada de mesa Sorvall (modelo RT7, Wilmington, EUA) para obtenção do plasma. A alíquotas de 1ml de plasma foram acrescentados 7 ml de solução cintiladora (PPO/dimetil-POPOP/tritonX-100/tolueno, 5g:0,5g:333ml:667ml) para a contagem da radioatividade do [^3H] e [^{14}C] num cintilador líquido Beckman LS-100°C.

3.6. Determinações complementares

As dosagens bioquímicas de mucoproteínas, γ GT, fosfatase alcalina, β 2-microglobulina, bilirrubina total e frações, proteínas totais e frações, creatinina, uréia, glicemia, lactato desidrogenas (DHL), aminotransferases (ALT e AST) foram realizadas com equipamento automático (COBAS MIRA PLUS - ROCHE). O CT, os TG e o HDL-C foram determinados por método colorimétrico enzimático, utilizando-se "kits" da ROCHE, para colesterol UNIMATE 7 CHOL: método GPO/PAD, e TG UNIMATE 5 TRIG: método CHOD/PAD. Para obtenção do HDL-C foi realizada a precipitação da apoB (VLDL e LDL) com HDL Reagent ROCHE: método ácido fosfotungstênio/cloreto de magnésio. VLDL-C foi calculado dividindo-se o valor de TG por cinco. LDL-C foi determinado pela diferença entre o CT e a soma de VLDL-C e HDL-C (FRIEDWALD e col., 1972). As Apo, A1 e B foram determinadas pelo método de imunodifusão radial simples, respectivamente, com as placas Lipo-Partigenr-Apo,A1 e Nor-Paringen R da Hoechst-Behring (Rueli-Malmaison, França). Foi empregado o método de radioimunoensaio para determinação específica do nível plasmático de Lp (a) com o kit da Pharmacia (Uppsala, Suécia) (R). O TNF- α e o INF- γ foram determinados pelo método de ELISA.

3.7. Análise dos dados

3.7.a. Cálculo dos parâmetros cinéticos

A taxa fracional de remoção (TFR) para os dois marcadores foi calculada de acordo com o método descrito por MATTHEWS (1957), usando a equação:

$$TFR = \left(\frac{a_1}{\alpha_1} + \frac{a_2}{\alpha_2} \right)^{-1}$$

em que a_1 , a_2, α_1, α_2 foram calculados pelo ajuste não linear dos mínimos quadrados dos dados experimentais de radioatividade residual a curvas exponenciais de equação:

$$Y(t) = (a_1 \cdot e^{-\alpha_1 t}) + (a_2 \cdot e^{-\alpha_2 t})$$

em que y representa o decaimento da radioatividade plasmática.

3.7.b. Índice de lipólise

O decaimento plasmático do ^{14}C -CE reflete a remoção do quilomícron pelo receptor, enquanto que o decaimento do ^3H -TG reflete a somatória entre a remoção pelas vias lipolíticas e de receptor. Desta forma, o índice de lipólise (ILip) foi definido como a quantidade de ^3H -TG removido por lipólise, e calculado pela fórmula:

$$ILip = \frac{(ASC \text{ } ^{14}\text{C} - CE) - (ASC \text{ } ^3\text{H} - TG)}{ASC \text{ } ^{14}\text{C} - CE}$$

em que ILip=índice de lipólise e ASC=área sob a curva.

3.7.c. Análise estatística dos dados

O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi aplicado para se analisar as diferenças entre os valores de triglicérides e dos TFRs da emulsão. A análise estatística e a representação dos dados foram realizadas com auxílio de programas para computador compatível com o IBM-PC GraphPad InPlot, versão 4.00, 1992 e GraFit, versão 3.0, 1992. Todas as variáveis registradas foram tabeladas como média \pm SEM ou média \pm SD.

3.8. Requisitos éticos e legais

Antes de iniciar o estudo, cada participante foi informado acerca dos propósitos e duração da pesquisa, dos procedimentos funcionais e clínicos, dos exames bioquímicos e da injeção da emulsão artificial marcada com radioisótopos. A realização desse protocolo foi aprovada pela Comissão de Normas Éticas e Regulamentares da Santa Casa de São Paulo e do Instituto do Coração (InCor). Todos os participantes do projeto assinaram um termo de consentimento pós-informação. Impacto radiológico foi avaliado pelo método MIRD - Medical Internal Radiological Dosimetry e expresso pela dose equivalente comprometida no corpo inteiro em consequência da incorporação de materiais radioativos. Essa dose foi estimada em 0,04 mSv, estando em conformidade com as normas de radioproteção (Comissão Nacional de Energia Nuclear, 1988 e National Council on Radiation Protection, 1985).

RESULTADOS

1. Perfil lipídico

A tabela 7 resume os resultados do perfil lipídico do grupos controle LNH e LH. A Figura 3 mostra a comparação gráfica da média±SEM de cada grupo. O valor de TG, embora maior nos grupos LNH e LH, não foi diferente estatisticamente do que, no grupo controle. Não se constataram diferenças entre as médias de CT, LDL-C, HDL-C, VLDL-C e Lp(a) nos grupos LNH e LH quando comparados com o grupo controle. A figura 4 mostra a comparação gráfica da média±SEM dos parâmetros de ApoA1 e ApoB nos grupos de LNH, LH e controle. Também, não houve diferenças entre a média da ApoA1 e ApoB nos grupos de LNH e LH em relação ao controle.

Tabela 7. Perfil lipídico dos indivíduos do grupo controle e dos portadores de LNH E LH. Os valores representam a média±SEM.

Parâmetro	Controle (n=12)	LNH (n=19)	LH (n=11)	p
TG(mg/dl)	96,27±11,63	141,1±16,4	118,1±21,9	ns
CT(mg/dl)	179,5±10,93	198,9±11,7	183±9,9	ns
LDL (mg/dl)	111,9±9,02	126,6±10,2	109,1±10,9	ns
HDL (mg/dl)	48,36±3,5	43,9±3,3	50,0±3,8	ns
VLDL(mg/dl)	19,25±2,32	26,2±3,4	23,7±4,4	ns
Lp(a) (mg/dl)	27,94±7,9	32,7±6,7	38,2±10,2	ns
ApoA1(g/l)	1,81±0,18	1,82±0,22	2,31±0,24	ns
ApoB(g/l)	1,22±0,06	1,10±0,09	1,22±0,08	ns

Abreviaturas: TG: triglicérides; CT: colesterol total; LDL: colesterol de LDL; HDL: colesterol de HDL; VLDL: colesterol de VLDL; Lp(a): lipoproteína (a); ApoA1: apolipoproteína A1; ApoB: apolipoproteína B; ns: não significante p 0,05.

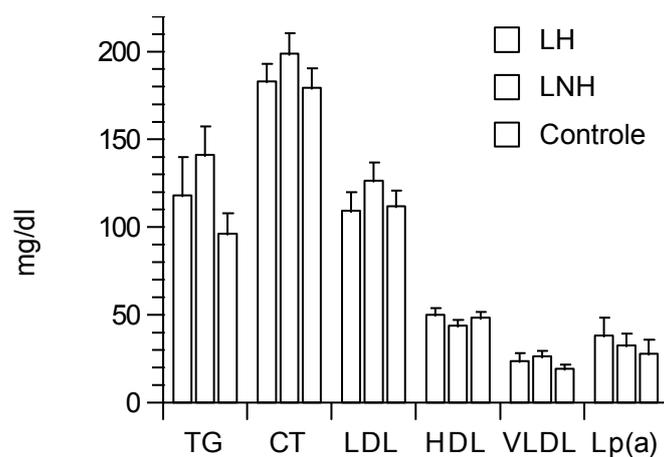


Figura 3. Concentração plasmática dos lipídeos nos grupos controle, LNH e LH. As barras representam a média \pm SEM. Controle n=12, LNH n=19 e LH n=11.

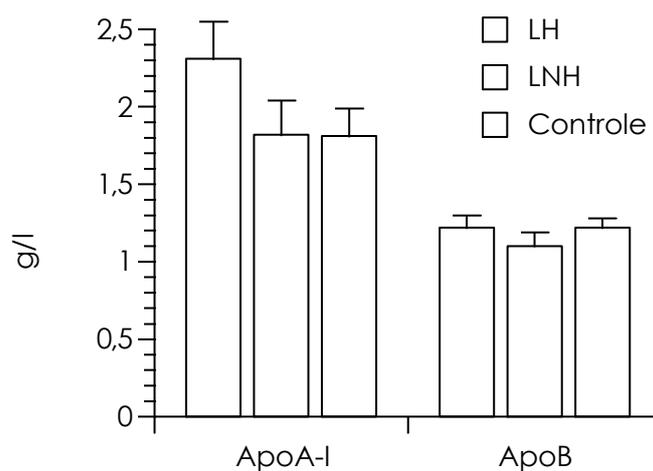


Figura 4: Concentração plasmática das apolipoproteínas nos grupos controle, LNH e LH. As barras representam a média \pm SEM. Controle n=12, LNH n=19 e LH n=11.

2. Dosagem de TNF- α e INF- γ .

A concentração plasmática de TNF- α e de INF- γ se encontra na tabela 8. A figura 7 ilustra a comparação entre as médias dos três grupos.

Tabela 8: Determinação das citocinas (TNF- α e INF- γ) nos grupos de LNH, LH e controle. Os valores representam a média \pm SEM.

Grupo	TNF- α (pg/ml)	p*	INF- γ (pg/ml)	p*
CONTROLE (n=12)	0,70 \pm 0,32	-	0,44 \pm 0,24	-
LH (n=11)	0,20 \pm 0,04	0,3413	44,80 \pm 15,10	<0,0001
LNH (n=19)	40,20 \pm 40,00	0,2366	52,90 \pm 12,80	0,0007

TNF- α , fator de necrose tumoral alfa; INF- γ , interferon gama. * p foi calculado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney comparando-se grupos experimental e controle.

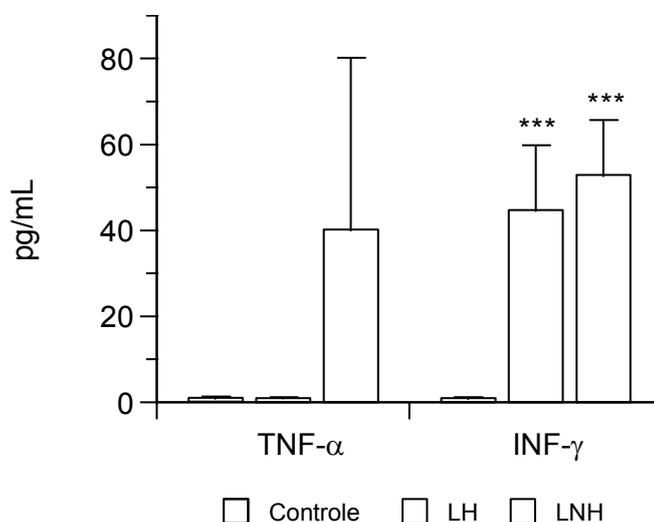


Figura 5. Concentração plasmática das citocinas TNF- α e INF- γ . As barras representam a média \pm SEM. ***, $p < 0,001$.

3. Remoção plasmática dos quilomícrons artificiais

As tabelas 19 e 20 mostram os valores das médias da TFR do $^3\text{H-TG}$ e do $^{14}\text{C-CE}$ (TFRTG e TFRCE, respectivamente) e do índice de lipólise da emulsão de quilomícrons artificiais. A figura 8 ilustra a comparação da média \pm SEM desses parâmetros.

Tabela 9. Parâmetros cinéticos da remoção plasmática de ^{14}C -CE e ^3H -TG para o grupo LNH comparado com o grupo controle. Os dados representam a média \pm SEM.

Parâmetro	Controle (n=12)	LNH (n=19)	p*
TFR _{TG} (min ⁻¹)	0,151 \pm 0,032	0,043 \pm 0,007	0,0069
TFR _{CE} (min ⁻¹)	0,069 \pm 0,013	0,016 \pm 0,0022	<0,0001
Ílip(%)	44,6 \pm 7,27	27,9 \pm 4,17	0,0400

n:número de pacientes ; Ílip: Índices de Lipólise; TFR_{TG}:taxa fracional de remoção de triglicérides; TFR_{CE}: taxa fracional de remoção de éster de colesterol (MATTHEWS,1957); *p foi calculado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney comparando-se grupos experimental e controle.

Tabela 10. Parâmetros cinéticos da remoção plasmática de ^{14}C -CE e ^3H -TG para o grupo LH comparado com o grupo controle. Os dados representam a média \pm SEM.

Parâmetro	Controle (n=12)	LH (n=11)	P
TFR _{TG} (min ⁻¹)	0,151 \pm 0,032	0,045 \pm 0,009	0,0001
TFR _{CE} (min ⁻¹)	0,069 \pm 0,013	0,024 \pm 0,006	0,0086
Ílip(%)	44,6 \pm 7,27	24,6 \pm 5,52	0,0425

Abreviaturas: n:número de pacientes ; Ílip: Índices de Lipólise; TFR_{TG}:taxa fracional de remoção de triglicérides; TFR_{CE}: taxa fracional de remoção de éster de colesterol (MATTHEWS,1957); * p foi calculado pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney comparando-se grupos experimental e controle.

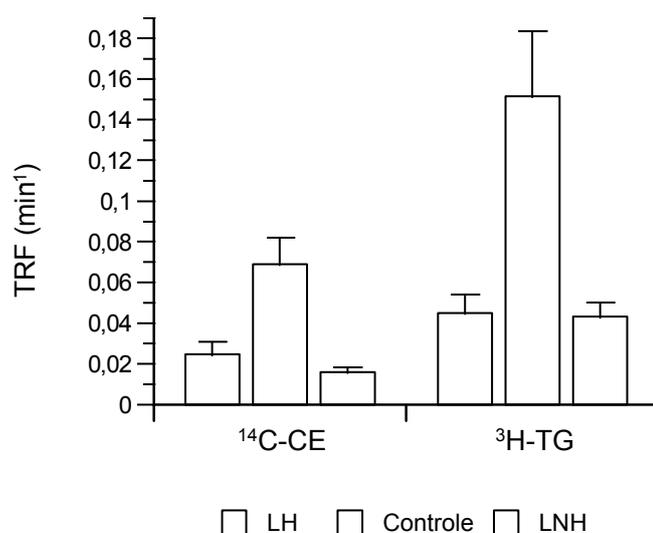


Figura 6. Taxa fracional de remoção do quilomícrom artificial. As barras representam a média \pm SEM dos valores obtidos. TFR, taxa fracional de remoção em min^{-1} (MATTHEWS, 1957); controle (n=12); LNH (n=19) e LH (n=11). CE, $^{14}\text{C-CE}$; TG, $^3\text{H-TG}$.

A comparação entre as curvas médias de decaimento plasmático de $^{14}\text{C-CE}$ e $^3\text{H-TG}$ nos grupos controle, LNH e LH está ilustrada nas figuras 7 e 8, respectivamente. As curvas de remoção dos grupos LNH e LH são claramente mais lentas tanto para trioleína quanto para o oleato de colesterol.

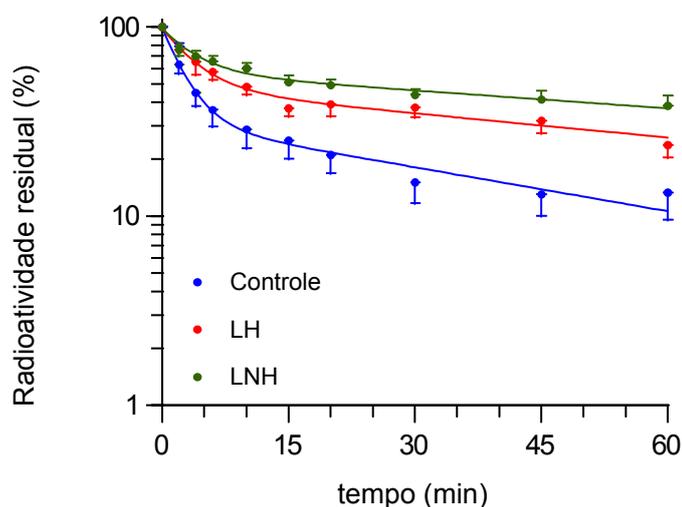


Figura 7. Curva de decaimento plasmático do $^{14}\text{C-CE}$ nos grupos controle, LNH e LH (MATTHEWS 1957). As barras correspondem ao erro padrão da média.

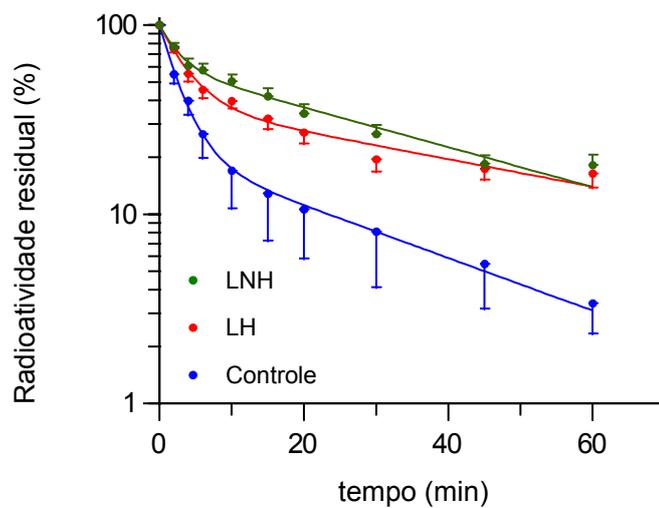


Figura 8. Curva de decaimento plasmático do $^3\text{H-TG}$ nos grupos controle, LNH e LH (MATTHEWS, 1957). As barras correspondem ao erro padrão da média.

DISCUSSÃO

Alterações no metabolismo lipídico em seres humanos e em animais com neoplasias malignas têm sido bem documentadas na literatura. Entretanto, os mecanismos envolvidos são pouco esclarecidos devido, principalmente, às dificuldades na avaliação do metabolismo dos lipídeos do ciclo exógeno.

Várias metodologias utilizadas na avaliação do metabolismo dos QM foram descritas na introdução do presente trabalho, dentre elas, o teste do palmitato de retinol. O teste de absorção do palmitato de retinol apresenta limitações na sua interpretação, uma vez que os dados plasmáticos são afetados não somente pela remoção, mas também pela cinética de absorção do palmitato de retinol do lúmen intestinal. Além do mais, o método não é prático, portanto sendo inapropriado o seu uso na rotina laboratorial.

A metodologia empregada no presente trabalho utiliza a injeção de uma emulsão artificial semelhante ao QM natural desprovida de proteínas. Embora a emulsão seja desprovida de apolipoproteínas, ela as adquire ao penetrar na circulação sanguínea. O contato das partículas da emulsão com as demais lipoproteínas favorece a transferência de uma boa parte das apolipoproteínas. A única exceção é a apo B, que é pouco solúvel, portanto, não passível de troca entre as partículas (REDGRAVE e col., 1985). Por sua vez, as partículas da emulsão são dotadas dos elementos que modulam o metabolismo das lipoproteínas. A partícula, então, sofre um processo lipolítico intravascular semelhante ao que ocorre com os QM naturais como demonstrado em ratos (HIRATA e col, 1987). A maior parte dos TG da emulsão é hidrolizada gerando partículas de tamanho e composição diferentes que são os remanescentes de QM, etapa do metabolismo denominada de lipólise. Os QMrem se caracterizam por ter um conteúdo maior de EC do que de TG. Os mesmos são removidos da circulação via receptores B/E e LRP no tecido hepático, etapa do metabolismo denominada de captação ou remoção. O fato de sofrerem um processo de

lipólise, já na circulação, confere aos triglicérides uma remoção plasmática mais rápida em relação ao EC.

Uma das vantagens da metodologia da emulsão de quilomícrons artificiais, em relação a outros procedimentos descritos na literatura, consiste no fato de que todos os passos do metabolismo do quilimícron são acompanhados através de dois dispositivos simultâneos de marcação: o ^{14}C -CE representa a remoção das próprias partículas da emulsão pelos órgãos e o ^3H -TG que reflete a soma dos dois processos, o de hidrólise do triacilglicerol das partículas da emulsão pela LPL e o de remoção plasmática das partículas remanescentes contendo o triacilglicerol residual.

A hipertrigliceridemia secundárias as neoplasias malignas tem sido um achado freqüente, tanto nas leucemias como nos linfomas. Spiegel e col.(1982) demonstraram um aumento nos níveis de TG e VLDL e uma diminuição nos níveis plasmáticos de HDL em pacientes com LA e com LNH não tratados. No entanto, os níveis séricos dos lipídeos e das lipoproteínas retornaram aos valores normais com a remissão da doença. Vários estudos têm demonstrado que a hipertrigliceridemia se deve mais a um aumento na síntese hepática de VLDL do que a uma diminuição da remoção plasmática das lipoproteínas ricas em triglicérides como os QM e as VLDL. Entretanto por razões metodológicas já discutidas na introdução, o metabolismo dos QM é pouco explorado nas neoplasias.

Os níveis plasmáticos de colesterol total e das frações LDL, HDL e VLDL dos portadores de LNH e LH não diferem do grupo controle. Em relação aos níveis de triglicérides tanto o grupo de LH quanto do LNH apresentam níveis mais elevados que o grupo controle, embora não estatisticamente significante. Os valores de Lp(a) encontrados nos pacientes com LNH e LH não diferem daqueles encontrados no grupo controle. Também não houve diferença estatística entre os grupos com relação à apo A-I e à apo B.

Como já descrito anteriormente, a remoção plasmática de QM e VLDL depende fundamentalmente da ação da LPL, enzima responsável pela hidrólise dos triglicérides nestas lipoproteínas. Estudos "in vitro" demonstram que a atividade da LPL é inibida por citocinas. Estas, por sua vez, parecem estar envolvidas na patogênese dos linfomas. Alguns trabalhos avaliam o perfil das citocinas nos linfomas e tentam correlacioná-las com o tipo histológico e ou com os achados clínicos. Gause e col.(1992) demonstraram níveis séricos elevados das citocinas IL-3, IL-6, e GM-CSF em pacientes com LH sem tratamento. O TNF- α e a IL-1 beta foram detectáveis em, somente, 3 dos 43 pacientes.

O grupo não detectou qualquer correlação entre os níveis séricos de citocinas com os achados clínicos ou com outro parâmetro laboratorial. Kurzrock e col.(1993) obtiveram resultados semelhantes em 28 pacientes com LH e em 32 com LNH, em que os níveis séricos das citocinas INF- γ , TNF- α , IL-1 beta não foram estatisticamente significantes, em relação ao grupo controle, e detectou níveis elevados da IL-6. Blay e col.(1994) demonstraram níveis elevados de IL-1, IL-2 e IL-6 em pacientes com LH não tratados e nenhuma diferença em relação ao TNF- α , no entanto não houve correlação com sintomas clínicos, subtipos histológicos e com os outros parâmetros como VHS, fibrinogênio e contagem de plaquetas. Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença, estatisticamente significativa, entre os níveis de INF- γ , TNF- α e IL-1 em relação ao grupo controle. Gorschluter e col.(1995) demonstraram um aumento nos níveis de IL-6, IL-7, IL-8, sIL-2R e G-CSF em pacientes com LH quando comparados com o grupo controle. Já os níveis séricos da IL-2, IL-3, IL-4, TNF- α , TNF- β e GM-CSF foram raramente detectáveis nesses pacientes. O aumento dos níveis de IL-6, IL-7 e sIL-2R foram correlacionados com estágio avançado do LH e juntamente com os níveis de G-CSF com a presença de sintomas clínicos. Os nossos resultados são concordantes com os da literatura, uma vez que os níveis de séricos de TNF- α não foram detectáveis, na maioria dos pacientes, com exceção de um portador de LNH que apresentou níveis muito elevados, embora a concentração plasmática de INF- γ tenha sido, significativamente, maior nos grupos LH e LNH.

Nomura e col.(1997) avaliaram uma possível correlação entre os níveis de IL-6 e a atividade da LPL ou a com a progressão do tumor em pacientes com câncer de mama e gastrointestinal. A redução da atividade da LPL, nesses pacientes, não foi correlacionada com os níveis plasmáticos da IL-6 nem com progressão do tumor. Vários grupos, no entanto, apontam as citocinas como possíveis reguladores no metabolismo lipídico em diferentes patologias. Tengku-Muhammad e col.(1998) sugerem um sinergismo entre INF- γ e TNF- α na regulação da LPL. Tanto INF- γ quanto TNF- α são pirogênicas e podem inibir o processo lipogênico. No nosso trabalho procuramos detectar os níveis de INF- γ e TNF- α em nossos pacientes e no grupo controle, com a finalidade de associar possíveis alterações com os achados clínicos, subtipos histológicos, parâmetros bioquímicos e, principalmente, com as alterações no metabolismo lipídico. Os resultados obtidos, no presente trabalho compartilham, de certa forma, com os achados obtidos pelos grupos acima em que os níveis de TNF- α em pacientes com LH e LNH (com exceção de um paciente do grupo LNH) tratados não

foram estatisticamente diferentes do grupo controle. O mesmo não ocorreu em relação aos níveis séricos de $\text{INF-}\gamma$ quando comparados com o grupo controle. Entretanto, não houve correlação entre o aumento dos níveis de $\text{INF-}\gamma$ com o estágio clínico nem com a presença de sintomas clínicos (febre, perda de peso, sudorese noturna). Analisando os grupos de LH e LNH, separadamente, os resultados foram similares. Kalmanti e col.(1993) determinaram os níveis séricos de $\text{TNF-}\alpha$ e de sIL-2RA em crianças (6 meses a 14 anos) com LLA, LH e LNH, no diagnóstico e após a remissão, e compararam a um grupo controle. Obtiveram como resultado um aumento nos níveis séricos de $\text{TNF-}\alpha$ e de sIL-2RA nos três grupos em relação ao controle, porém este resultado diminuiu, significativamente, com a remissão. Por outro lado, esses níveis aumentaram à medida que avançaram os estágios da doença. Já na LLA os mesmos se encontravam mais elevados em pacientes que não responderam bem ao tratamento. O grupo acredita que os níveis séricos de $\text{TNF-}\alpha$ e de sIL-2RA possam ser úteis como marcadores da atividade e prognóstico da LLA e dos linfomas em crianças. Neste contexto, achamos por vez determinar o perfil das citocinas, $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{INF-}\gamma$, nos grupos em estudo, na tentativa de correlacionarmos a diminuição da lipólise, nos grupos de LH e LNH em relação ao controle, com uma suposta diminuição da atividade da LPL. Nossos resultados em relação à determinação do $\text{TNF-}\alpha$ foram semelhantes aos encontrados na literatura, com exceção de apenas um único paciente do grupo LNH, tendo os demais apresentado níveis não detectáveis de $\text{TNF-}\alpha$, embora a concentração plasmática de $\text{INF-}\gamma$ tenha sido, significativamente, maior nos grupos LH e LNH. Todos os pacientes, em estudo, se encontravam em fase de tratamento e com doença em atividade. Isso indica que o clone maligno ainda não fora totalmente suprimido. Esta condição poderia explicar o aumento dos níveis séricos de $\text{INF-}\gamma$ nesses pacientes.

Todavia, a partir dos resultados obtidos no presente estudo, chegamos à hipótese de que o efeito inibitório do $\text{INF-}\gamma$ sobre a LPL constitui a possibilidade mais fascinante a ser investigada.

Sakashita(1995) demonstrou uma alteração no metabolismo dos QM tanto a nível de lipólise quanto de remoção dos QMrem em pacientes com LLA e nenhuma alteração no metabolismo de QM nos pacientes com LLC. Os pacientes com LLA e LLC foram estudados antes do início da quimioterapia e apresentavam níveis elevados de TG e VLDL. No entanto, não houve correlação entre a concentração basal de triglicérides e a TFR-TG ou com a quantidade de triglicérides removida pela via lipolítica nos grupos com LLA e LMA. O grupo conclui que o metabolismo da emulsão é

independente dos eventos que determinam a concentração das VLDL no plasma. Hungria(1997), utilizando a emulsão artificial em pacientes portadores de mieloma múltiplo estadio III A, sem tratamento, obteve como resultado uma diminuição de remoção plasmática do QM sem alteração da lipólise. Esse resultado é, de certa forma, contradiz com a hipótese de que a remoção plasmática do ^{14}C -EC é dependente do processo de lipólise. Com relação à lipólise do QM, não encontramos diferença entre os grupos de LH e LNH, embora ambos apresentassem diminuição de lipólise com relação ao grupo controle. A captação dos QMrem, tanto no grupo LH quanto no LNH, estava diminuída.

Todos os resultados obtidos com a emulsão artificial semelhante aos QM naturais, padronizada por Redgrave e Maranhão, em pacientes com leucemias aguda e crônica, linfoma e com MM, indicam uma diferença básica de regulação metabólica entre estas entidades. Deve-se, no entanto, levar em consideração uma série de fatores que estão implicados, dentre eles: o tipo celular envolvido, o tratamento ou sua ausência, liberação de citocinas pelo clone maligno e/ou em resposta imune pelo próprio organismo, a heterogeneidade existente dentro dos linfomas no que diz respeito ao tipo histológico, curso clínico e prognóstico, conseqüentemente espera-se que o metabolismo lipídico deva variar. Nossos resultados apoiam a hipótese de que, nos linfomas assim como nas leucemias agudas e no MM, há uma alteração importante no metabolismo dos quilomícrons, ao contrário das leucemias crônicas.

SILVA e col.(1994) obtiveram alterações no clearance de QM artificial em camundongos com tumor de Walter 256, submetidos a uma dieta rica em gordura poliinsaturada, ao contrário do outro grupo, o dos camundongos com o tumor de Walter 256 submetidos a uma dieta rica em ácido graxos saturados em que as alterações no clearance de QM artificial não foram visíveis. Os autores desse trabalho, no entanto, procuram enfatizar que uma dieta rica em ácido graxo saturado utilizada nesses animais, possa evitar alterações no processo lipolítico do QM artificial, uma vez que não houve diferença na FCR-TG e FCR-CE entre os grupos controles.

A meta principal da quimioterapia anticâncer é a redução da carga tumoral, através de drogas que bloqueiam funções vitais ou a capacidade de divisão das células malignas. Tozuka e col.(1997) avaliaram a concentração plasmática de triglicérides e de apolipoproteínas em crianças, portadores de LLA e de linfomas, que foram tratadas com as seguintes drogas: L-asparaginase, prednisona e vincristina. Uma hipertrigliceridemia aguda e severa foi obtida em 8 dos 19 pacientes tanto com LLA

quanto com linfoma, no período de 8 a 14 dias após o tratamento com as drogas já citadas, acompanhado de um aumento precoce da relação das apoCIII/apoCII e de uma diminuição na concentração plasmática de fibrinogênio. O grupo atribui a causa da hipertrigliceridemia induzida pelo tratamento a um possível desequilíbrio da relação apo CIII/apo CII a favor da apo CIII, uma vez que já é estabelecido na literatura que a apoCIII age inibindo a ação da LPL e a apo CII como ativador da LPL. Baseados nesses achados, é possível postularmos se as alterações obtidas em nosso estudo não possam ter sido influenciadas pelo tratamento, uma vez que as drogas, acima mencionadas, fazem parte do protocolo utilizado no tratamento tanto do LH quanto do LNH. No entanto, o fato de os níveis de triglicérides, nos grupos em estudo, se encontrarem dentro dos limites de normalidade associado com uma certa variabilidade nos números de ciclos aplicados nesses pacientes, leva-nos a descartar esta possibilidade, embora devamos acrescentar ao estudo, além das determinações já realizadas de apoA1, ApoB, as apoCIII e apoCII.

Em suma, a tendência é o esclarecimento, por completo, do metabolismo dos QM através de metodologias mais práticas como as emulsões artificiais semelhantes ao QM natural, conforme a que foi utilizada no presente estudo. Nossos resultados, portanto, abrem uma nova frente de estudo ao apontar alterações importantes no metabolismo de QM tanto na doença de Hodgkin quanto nos linfomas não-Hodgkin, dada à grande importância do metabolismo dos lipídeos de dieta no contexto das neoplasias malignas. Por outro lado, resta uma questão de extrema importância que urge ser respondida, que são as possíveis causas para essa alteração metabólica.

CONCLUSÕES

1. A remoção plasmática da emulsão é semelhante nos dois grupos de linfoma.
2. Uma diminuição da remoção plasmática e da lipólise da emulsão nos dois grupos de linfomas quando comparados com o grupo controle.
3. A diminuição da remoção plasmática e da lipólise do QM artificial podem ser atribuídas a diminuição da atividade da LPL.
4. Esse efeito pode ser devido a:
 - diminuição da expressão da LPL;
 - diminuição da expressão da ApoC-II;
 - aumento da expressão da ApoC-III.
5. Tanto o INF- γ quanto os quimioterápicos podem ser parcialmente responsáveis pelos efeitos observados neste trabalho.

RESUMO

Os quilomícrons são lipoproteínas ricas em triglicérides. Na circulação sistêmica os triglicérides são hidrolisados pela LPL e os ácidos graxos liberados são utilizados para geração de energia. A partícula resultante, o QMrem é enriquecida com apoE no espaço de Disse e captada pelos receptores de LDL e pela LRP presentes no hepatócito. O presente trabalho objetivou verificar se o metabolismo dos quilomícrons estaria alterado nos linfomas não Hodgkin e doença de Hodgkin. Emulsões artificiais semelhantes aos quilomícrons naturais foram injetadas, via endovenosa, em 19 pacientes com linfoma não Hodgkin, 11 com doença de Hodgkin e em 12 indivíduos saudáveis. As emulsões foram marcadas com colesterol esterificado e triacilglicérides radioativos, e as curvas de decaimento plasmático desses isótopos foram determinadas no plasma, a partir de amostras colhidas em intervalos regulares durante 60 minutos. Os resultados mostraram que não houve diferença na remoção plasmática, tanto dos triglicérides quanto do colesterol esterificado, entre os dois grupos de linfomas. No entanto, quando comparados com o grupo controle, os dois grupos de linfomas demonstraram diminuição na remoção tanto de $^3\text{H-TG}$ quanto $^{14}\text{C-CE}$. Permitindo concluir que o processo de lipólise e de remoção dos QMrem está alterado nos LNH e LH, com possíveis implicações no manejo clínico e nutricional desses pacientes.

SUMMARY

Chylomicrons(QM) are lipoprotein rich in triglycerides(TG). In the systemic circulation, the triglycerides are hydrolyzed by the LPL and the released fatty acids are employed in the production of energy. The resultant particle, which is QMrem, is enriched with apoE in the Disse space and captured by the LDL receptors and by the LRP which are present in the hepatocyte. The present work aimed to verify if the chylomicrons metabolism would be altered in non-Hodgkin's lymphoma, 11 with Hodgkin's disease and 12 healthy subjects. Emulsions were marked with cholesterol esterified and radioactive triacylglycerides, and the plasmatic disappearance curve of these isotopes were determined in the plasma from samples collected at regular intervals during 60 minutes. The results pointed out that there was no difference in the plasmatic removal, both in the triglycerides as well as in the cholesterol esterified, between the two lymphoma groups. However, when compared to the control group, the two lymphoma groups displayed a reduction in the removal of both $^3\text{H-TG}$ as well as $^{14}\text{C-CE}$, leading to believe that the lipolysis process and QMrem removal is altered in LNH and LH, with possible implication in the clinical and nutritional management of these patients.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSEN, J.M., TURLEY, S.D., DIETSCHY, J.M. Low and high density lipoproteins and chylomicrons as regulators of rate of cholesterol synthesis in rat liver in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 76, p. 165-169, 1979.
- ANGELIN, B., RAVIOLA, C.A., INNERATY, T.L., MAHLEY, R.W. Regulation of hepatic lipoprotein receptors in the dog, rapid regulation of apolipoproteins B,E receptors but not of apolipoprotein E receptors, by intestinal lipoproteins and bile acids. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 71, p. 816-831, 1983.
- APPLEBAUM-BOWDEN, D. Lipases and lecithin:cholesterol acyltransferase in the control of lipoprotein metabolism. **Curr. Opin. Lipidol.**, Baltimore, v. 6, p.130-135,1995.
- ARBEENY, C.M., RIFICI, V.A. The uptake of chylomicron remnants and very low density lipoprotein-remnants by the perfused rat liver. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 259, p. 9662-9666, 1984.
- AXELROD, L., COSTA, G. Contribution of fat loss to weight loss in cancer. **Cancer**, Philadelphia, v. 2, p. 81-83, 1980.
- BABAYAN, R.K., DEVEREUX, D.F. Alteration of lipid metabolism associated with renal adenocarcinoma in the Wistar-Lewis rat. **J. Urol.**, Baltimore, v. 132, p. 410-411, 1984.
- BENNETT, M.H., FARRER-BROWN, G., HENRY, K. & JELLIFFE, A.M. Classification of non-Hodgkin's lymphomas(Letters). **Lancet**, New York, ii, p.405, 1974.
- BERGMAN, E.N., HAVEL, R.J., WOLFE, B.M., BOHMER, T. Quantitative studies of the metabolism of chylomicron triglycerides and cholesterol by liver and extrahepatic tissues of sheep and dogs. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 50, p. 1831-1839, 1971.
- BERR, F. Characterization of chylomicron remnant clearance by retinyl palmitate label in normal humans. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 33, p. 915-930, 1992.
- BERR, F., KERN Jr. F. Plasma clearance of chylomicrons labeled with retinyl palmitate in healthy human subjects. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 25, p. 805-812, 1984.

- BEUTLER, B.A., CERAMI, A. Recombinant interleukin 1 supresses lipoprotein lipase activity in 3T3-L1 cells. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 135, p. 3969-3971, 1985.
- BISGAIER, C.L., GLICKMAN, R.M. Intestinal synthesis, secretion, and transport of lipoproteins. **Annu. Rev. Physiol.**, Polo Alto, v. 45, p. 625-636, 1983.
- BLAY, J.Y., FARCET, J.P., LAVAUD, A., RADOUX, D., CHOUAIB, S. Serum concentrations of cytokines in patients with Hodgkin's disease. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v. 30, p. 321-324, 1994.
- BORENSZTAJN, J., GETZ, G.S., KOTLAR, T.J. Uptake of chylomicron remnants by the liver: further evidence for modulating role of phospholipids. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 29, p. 1087-1096, 1988.
- BREWER, H.B., GREGG, R.E., HOEG, J.M., FOJO, S.S. Apolipoproteins and lipoproteins in human plasma: an overview. **Clin. Chem.**, Washington, v. 34, n.8, p. B4-8, 1988.
- BROWN, M.S., GOLDSTEIN, J.L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. **Science**, Washington, v. 232, p. 34-47, 1986.
- _____. Scavenging for receptors. **Nature**, London, v. 343, p. 508-509, 1990.
- BROWN, M.S., KOVANEN, P.T., GOLDSTEIN, J.L. Regulation of Plasma Cholesterol by lipoprotein receptors. **Science**, Washington, v. 212, p. 628-635, 1981.
- BURT, M.E., GORSCHBOTH, C.M., BRENNAN, M.F. A controlled prospective, randomized trial evaluating the metabolic effects of enteral and parenteral nutrition in the cancer patients. **Cancer**, Philadelphia, v. 49, p. 1092-1105, 1982.
- CARBONE, P.P., KAPLAN, H.S., MUSSHOFF, K. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. **Cancer Res.**, Baltimore, v.31, p. 1860-1861, 1971.
- CHAPMAN, M.J., GOLDSTEIN, S., LAGRANGE, D., LAPLAUD, P.M. A density gradient ultracentrifugal procedure for the isolation of the major lipoprotein classes from human serum. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 22, p. 39-56, 1981.
- CHENG, C.F., COSTA, G.M., BENSADOUM, A., ROSENBERG, R.D. Binding of lipoprotein lipase to endothelial cells in culture. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 256, p. 12893-12898, 1981.

- CLARK, E.A., LANIER, L.L. Report from Vienna:in search of all surface molecules expressed on human leukocytes. **J. Clin. Immunol**, Baltimore, v. 9, p.265-272, 1989.
- COHEN, J.C. Chylomicron triglyceride clearance: comparison of three assessment methods. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v. 49, p. 306-313, 1989.
- COOPER, A.D. Hepatic uptake of chylomicron. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 38, p. 2173-2191, 1997.
- CRYER, A. Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. **Int. J. Biochem**, Oxford, v. 13, p. 525-541, 1981.
- DECKELBAUM, R.J., EISENBERG, S., OSCHY, Y., GRANOT, E., SHARON, I., BENGTSOON-OLIVECRONA, G. Conversion of human plasma high density lipoprotein-2 to high density lipoprotein-3: roles of neutral lipid exchange and triglyceride lipases. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 261, p. 5201-5208, 1986.
- DORFMAN, R.F. Classification of non-Hodgkin's lymphomas (Letter). **Lancet**, New York , I, p.1295, 1974.
- ECKEL, R.H. Lipoprotein lipase - a multifunctional enzyme relevant to common metabolic diseases. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 320, p. 1060-1068, 1989.
- EISENBERG, S. High density lipoprotein metabolism. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 25, p. 1017-1058, 1984.
- EISENBERG, S., LEVY, R.I. Lipoprotein metabolism. **Adv. Lipid Res.**, New York, v.25 , p. 1017-1058, 1984.
- ERKELENS, D.W. Apolipoproteins in lipid transport, an impressionist view. **Postgrad. Med. J.**, London, v. 65, p. 275-281, 1989.
- EZDINILE, E.Z., ANNDERSON, J.R., MELVIN, F., GLICK, J.H., DAVIS, T.E., O'CONNELL, M.J. Moderate versus aggressive chemotherapy of nodular lymphocytic poorly differentiated lymphoma. **J. Clin. Oncol.**, Philadelphia, v. 3, p. 769-775, 1985.
- FRIEDWALD, W.T., LEVY, R.I., FREDRICKSON, D.S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. **Clin. Chem.**, Washington, v. 18, p. 499-502, 1972.
- GALLAGHER, C.J., GREGORY, W.M., JONES, A.E., STANSFIEL, A.G., RICHARDS, M.A., DHALIWAL, H.S., MALPAS, J.S., LISTER, T.A. Follicular lymphoma:

- prognostic factors for response and survival. **J. Clin. Oncol.**, Philadelphia, v. 4, p. 1470-1480, 1986.
- GAUBATZ, J.W., HEIDEMAN, C., GOTT Jr., A.M., MARRISETT, J.D. DAHIEN, G.H. Human plasma lipoproteina (a): structural properties. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 258, p. 4582-4589, 1982.
- GAUSE, A., KEYMIS, S., SCHOLZ, R., SCHOBERT, I., JUNG, W., DIEHL, V., POHL, C., PFREUNSDSCHUH, M., MEDIZISCHE KLINIK, I. Increased levels of circulating cytokines in patients with untreated Hodgkin's disease. **Lymphokine Cytokine Res.**, New York, v. 11, n. 2, p. 109-113, 1992.
- GÉRARD-MARCHANT, R., HAMLIN, I., LENNERT, K., RILKE, F., STANSFELD, A. G. & VAN UNNIK, J.A.M. Classification of non-Hodgkin's lymphomas.(Letter). **Lancet**, New York, ii p.406, 1974.
- GOLDSTEIN, J.L., ANDERSON, R.G.W., BROWN, M.S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. **Nature**, London, v. 279, p. 679-685, 1979.
- GORSCHLUTER, M., BOHLEN, H., HASENCLEVER, D., DIEHL, V., TESCH, H. Serum cytokine levels correlate with clinical parameters in Hodgkin's disease. **Ann. Oncol.**, Dordrecht, v. 6, n. 5, p. 477-482, 1995.
- GOTTO Jr., A.M. High density lipoproteins: biochemical and metabolic factors. **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 52, p. 2-4, 1983.
- GREGG, R.E., BREWER Jr., H.B. The role of apolipoprotein E and lipoprotein receptors in modulating the in vivo metabolism of apolipoprotein B-containing lipoproteins in humans. **Clin. Chem.**, Washinngton, v. 34, p. B28-32, 1988.
- GROGAN, T.M., SPIER, C.M., RICHTER, L.C. Immunologic approaches of the classification of non-Hodgkin lymphoma. In: BENNETT, J.M., FOON, K.A. (eds.). **Immunologic approaches to the classification and management of lymphoma and leukemias**. New York: Kluwer Academic Publissher, 1988.
- GRUNDY, S.M., MOK, H.Y.I. Chylomicron clearance in normal and hyperlipidemic man. **Metabolism**, Duluth Mn, v. 25, p. 1225-1239, 1976.
- HARRIS, N.L., JAFFE, E.S., STEIN, H. A Revised European-American classification of lymphoid neoplasm: a proposal from the International Lymphoma Study Group. **Blood**, Duluth Mn, v.84, p.1361-1392, 1994.

- HAVEL, R.J. The formation of LDL: mechanisms and regulation. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 25, p. 1570-1576, 1984.
- HAVEL, R.J., HAMILTON, R.L. Hepatocytic lipoprotein receptors and intracellular lipoprotein catabolism. **Hepatology**, ST. Louis, v. 8, p. 1689-1704, 1988.
- HAZZARD, W.R., BIERMAN, E.L. Delayed clearance of chylomicrons remnants following vitamin A-containing oral fat loads in broad- β disease (type III hypercholesterolemia). **Metabolism**, Duluth Mn, v. 25, p. 777-801, 1976.
- HIRATA, M.H., OLIVEIRA, H.C.F., QUINTÃO, E.C.R., REDGRAVE, T.G., MARANHÃO, R. C. The effects of Triton WR-1339, protamine sulphate and heparin on the plasma removal of emulsion models of chylomicrons and remnants in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 917, p. 344-346, 1987.
- HUNGRIA, V.T.M. **Cinética de remoção plasmática de quilomícrons artificiais em pacientes de mieloma múltiplo**. São Paulo, 1997. 95 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1997.
- ITO, Y., AZROLAN, N., O'CONNELL, A., WALSH, A., BRESLOW, J.L. Hypertriglyceridemia as a result of human apo CIII gene expression in transgenic mice. **Science**, Washington, v. 249, p. 790-793, 1990.
- JAMES, W.P.T., FERROLUZZI, A., WATERLOW, J.C. A fresh look at anthropometric classification schemes in protein energy malnutrition. **Eur. J. Clin. Nutr.**, London, v. 42, p. 969-981, 1988.
- JANERO, D.R., SIUTA-MANGANO, P., MILLER, K.W., LANE, M.D. Synthesis, processing, and secretion of hepatic very low density lipoprotein. **J. Cel Biochem.**, New York, v. 24, p. 131-152, 1984.
- KALMANTI, M., KARAMOLENGOU, K., DIMITRIOU, H., TOSCA, A. VLACHONIKOLIS, I., PERAKI, M. Serum levels of tumor nevrosis factor and soluble interleukin 2 receptor as markers of disease activity and prognosis in childhood leukemia and lymphoma. **Int. J. Hematol.**, Limerick, v. 57, n. 2, p. 147-152, 1993.
- KANE, J.P., HARMAN, D.A., PAULUS, H.E. Heterogeneity of apolipoprotein B: isolation of a new species from human chylomicrons. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 77, p. 2465-2409, 1980.

- KESANIEMI, Y.A., MIETTINEN, T.A. Metabolic epidemiology of plasma cholesterol. **Ann. Clin. Res.**, Philadelphia, v.20, p. 26-31, 1982.
- KIRCHGESSNER, T.G., SVENSON, K.L., LUSIS, A.J., SCHOTZ, M.C. The sequence of cDNA encoding lipoprotein lipase: a member of a lipase gene family. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 262, p. 8463-8466, 1987.
- KURZROCK, R., REDMAN, J., CABANILLAS, F., JONES, D., ROTHBERG, J., TALPAZ, M. Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 53, n. 9, p. 2118-2122, 1993.
- LADU, M.J., KAPSAS, H., PALMER, W.K. Regulation of lipoprotein lipase in adipose and muscle tissue during fasting. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 260, p. R953-959, 1991.
- LANZA-JACOBY, S., LANSEY, S.C., MILLER, E.E., CLEARY, M.P. Sequential changes in the activities of lipoprotein lipase and lipogenic enzymes during tumor growth in rats. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 44, p. 5062-5067, 1984.
- LEGASPI, A., JEEVANANDAM, M., STARNES Jr., H.F., BRENNAN, M.F. Whole body lipid and energy metabolism in the cancer patient. **Metabolism**, Duluth MN, v. 36, p. 958-963, 1987.
- LENNET, K. MOHRI, N., STEIN, H., KAISERLING, E. The Histopathology of Malignant Lymphoma. **Br J Heamatol**, 31, p.193, 1975(Suppl.).
- LEVY, E. Selected aspects of intraluminal and intracellular phases of intestinal fat absorption. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v. 70, p. 413-419, 1992.
- LUKES, R.J. & COLLINS, R. D. New approaches to the classification of the lymphomata. Symposium on Non-Hodgkin's Lymphoma, London. **Br. J. Cancer**, 31, Suppl. II, p.1, 1975.
- LUKES, R.J., CRAVER, L.F., HALL, T.C., RAPPAPORT, H., RUBIN, P. Report of Nomenclature Committee. **Cancer Res.**, Baltimore, v..26, p.1311, 1966b.
- LUKES, R.J., BUTLER, J.J. The Pathology and Nomenclature of Hodgkin's Disease. **Cancer Res.**, Baltimore , v. 26, p. 1063-1081, 1966a.

- MAHLEY, R.W., HUI, D.Y., INNERARITY, T.L., BEISIEGEL, U. Chylomicron remnant metabolism, role of hepatic lipoprotein receptors in mediating uptake. **Arteriosclerosis**, Washington, v. 9, sup. 1, p. 114-118, 1989.
- MARANHÃO, R.C., FERES, M.C., MARTINS, M.T., MESQUITA, C.H., TOFFOLETTO, O., VINAGRE, C.G.C., GIANINNI, S.D., PILEGGI, F. Plasma kinetics of a chylomicron-like emulsion in patients with coronary artery disease. **Arteriosclerosis**, Washington, v. 126 p. 15-25, 1996.
- MARANHÃO, R.C., TERCYAK, A.M., REDGRAVE, T.G. Effects of cholesterol content on the metabolism of protein-free emulsion models of lipoproteins. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 836, p. 247-255, 1986.
- MATTHEWS, C.M.E. The theory of tracer experiments with I-labeled plasma proteins. **Phys. Med. Biol.**, London, v. 2, p. 36-42, 1957.
- McANDREW, P.F. Fat metabolism and cancer. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 66, p. 1003-1012, 1986.
- MILLER, W.C., OSCAI, L.B. Relationship between type L hormone-sensitive lipase and endogenous triacylglycerol in rat heart. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v. 247, p. R621-625, 1984.
- NAKANDAKARE, E.R., LOTTENBERG, S.A., OLIVEIRA, H.C.F., BERTOLAMI, M.C., VASCONCELOS, K.S., SPEROTTO, G., QUINTÃO, E.C.R. Simultaneous measurements of chylomicron lipolysis and remnant removal using a doubly labeled artificial lipid emulsion: studies in normolipidemic and hyperlipidemic subjects. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 35, p.143-152, 1994.
- NESTEL, P.J. Relationship between plasma triglycerides and removal of chylomicrons. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 43, p. 943-949, 1964.
- Non-hodgkin's lymphoma pathologic classification project: National Cancer Institute-sponsored study of classifications of non-Hodgkin's lymphomas: Summary and description of a Working Formulation for clinical usage. **Cancer**, Philadelphia, v. 49, p. 2112, 1982.
- NORUMA, K., NOGUCHI, Y., YOSHIKAWA, T., KONDO, J. Plasma interleukin-6 is not a mediator of changes in lipoprotein lipase activity in cancer patients. **Hepatogastroenterology**, Stuttgart, v. 44, n.17, p. 1519-1526, 1997.

- OLIVEIRA, H.C.F., HIRATA, M.H., REDGRAVE, T.G., MARANHÃO, R.C. Competition between chylomicrons and their remnants for plasma removal: a study with artificial emulsion models of chylomicrons. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 958, p. 211-217, 1988.
- ONG, J.M., KIRCHGESSNER, T.G., SCHOTZ, M.C., KERN, P. A. Insulin increases the synthetic rate and messenger RNA level of lipoprotein lipase in isolated rat adipocytes. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 263, p. 12933-12938, 1988.
- OOI, T.C., SIMO, I.E., YAKICHUK, J.A.A. Delayed clearance of postprandial chylomicrons and their remnants in the hypoalphalipoproteinemia and mild hypertriglyceridemia syndrome. **Arterioscler. Thromb.**, Dallas, v. 12, p. 1184-1190, 1992.
- PATSCH, J.R., PRASAD, S., GOTTO Jr., A.M., Olivecrona, G.B. Postprandial lipemia: a key for the conversion of high density lipoprotein 2 into high density lipoprotein 3 by hepatic lipase. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 74, p. 2017-23, 1984.
- QUINN, D., SHIRAI, K., JACKSONS, R.L. Lipoprotein lipase: mechanism of action and role in lipoprotein metabolism. **Prog. Lip. Res.**, Oxford, v. 22, p. 35-78, 1982.
- RAPPAPORT, H., WINTER, W.J., HIEKS, E.B. Follicular lymphoma. A reevaluation of its position in the scheme of malignant lymphoma, based a survey of 253 cases. **Cancer**, Philadelphia, v. 9, p. 792-821, 1956.
- REDGRAVE, T.G., ZECH, L.A. A kinetic model of chylomicron core lipid metabolism in rats: the effect of a single meal. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 28, p. 473-482, 1987.
- REDGRAVE, T.G. Formation and metabolism of chylomicrons. **Int. Rev. Physiol.**, New York, v. 28, p. 103-130, 1983.
- REDGRAVE, T.G., CALLOW, M.J. The effect of insulin deficiency on the metabolism of lipid emulsion models of triacylglycerol-rich lipoproteins in rats. **Metabolism**, Duluth MN, v. 290, p. 843-847, 1993.
- REDGRAVE, T.G., MARANHÃO, R.C. Metabolism of protein-free lipid emulsion models of chylomicrons in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 835, p.104-112, 1985.
- REDGRAVE, T.G., DEVEREUX, D.F., DECKERS, P.J. Hyperlipidemia in tumor-bearing rats. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v. 795, p. 286-292, 1984.

- ROHEIM, P.S. Atherosclerosis and lipoprotein metabolism: Role of reverse cholesterol transport. **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 57, p. C3-10, 1986.
- ROSENBERG, A.S. Report of the Committee on the Staging of Hodgkin's Disease. **Cancer Res.**, Baltimore, v.26, p. 1310, 1966.
- ROSENBERG, A.S. Hodgkin's disease: challenges for the future. **Cancer Res** Baltimore, v. 49, p. 767-769, 1989.
- SAKASHITA, A.M. A **cinética de remoção plasmática de quilomícrons artificiais em pacientes portadores de leucemias**. São Paulo, 1995. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina – Universidade de São Paulo, 1995.
- SAXENA, U., WITTE, L.D., GOLDBERG, I.J. Release of endothelial cell lipoprotein lipase by plasma lipoproteins and free fatty acids. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 264, p. 4349-4355, 1989.
- SCHAEFER, E.J., ZECH, L.A., JENKINS, L.L., BRONZERT, T.J., RUBALCABA, E.A., LINDGREEN, F.T., AAMODT, R.L., BREWER Jr., H.B. Human apolipoprotein A-I and A-II metabolism. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 23, p. 850-862, 1982.
- SENDA, M., OKA, K., BROWN, W.V., QASBA, P.K., FURUICHI, Y. Molecular cloning and sequence of a cDNA coding for bovine lipoprotein lipase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v. 84, p. 4369-4373, 1987.
- SHELBURNE, F., HANKS, J., MEYERS, W., QUARFORDT, S. Effect of apoproteins on hepatic uptake of triglyceride emulsions in the rat. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 65, p. 652-658, 1980.
- SHERRIL, B.C., INNERARITY, T.L., MAHLEY, R.W. Rapid hepatic clearance of the canine lipoproteins containing only the E apoprotein by a high affinity receptor. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 255, p. 1804-1807, 1980.
- SILVA, E., MARANHÃO, R.C., CURI, R., GUIMARÃES, A.R.P., HIRATA, R. D.C., FERNANDES, L.C., HIRATA, M.H. Metabolism of a chylomicron like emulsion in rats with Walker 256 tumor: influence of a polyunsaturated (n-6) compared with a saturated fatty acid-rich diet. **J. Am. Coll. Nutr.**, New York, v. 13, p. 1-7, 1994.
- SKOTTOVA, N., SAVONEN, R., LOOKENE, A., HULTIN, M., OLIVECRONA, G. Lipoprotein lipase enhances removal of chylomicrons and remnants by the perfused rat liver. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v. 36, p. 1334-1344, 1995.

- SNEDECOR, G.W., COCHRAN, W.G. **Statistical methods**. 7.ed. Iowa: University Press, Ames, 1980 p. 507.
- SOUZA, C.A., BECHELLI, A.P.P., SCHETTERT, I.T., METZE, I.L., VASSALLO, J. Contribuição ao conhecimento clínico, epidemiológico e histopatológico da doença de Hodgkin, em população brasileira. **Bol. Soc. Bras. Hematol.**, Rio de Janeiro, v.19, n. 174, p. 3-15, 1997.
- SPIEGEL, R.J., SCHAEFER, E.J., MAGRATH, I.T., EDWARDS, B.K. Plasma lipid alterations in leukemia and lymphoma. **Am. J. Med.**, Newton MA, v. 72, p. 775-782, 1982.
- STANSFELD, A., DIEBOLD, J., KAPNACI, Y., KELENYI, G., LENNERT, K., MIODUSZEWSKA, O., NOEL, H., RILKE, F., SUNDSTROM, C., van UNNIK, J., WRIGHT, D. Updated Kiel classification for lymphomas. **Lancet**, New York , v.1, p.292-293, 1988.
- SULTAN, F., LAGRANGE, D., JANSEN, H., GRIGLIO, S. Inhibition of hepatic lipase activity impairs chylomicron remnant removal in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1042, p. 150-152, 1990.
- TALL, A., BLUM, C.B., FORESTER, G.P., NELSON, C.A. Changes in the distribution and composition of plasma high density lipoproteins after ingestion of fat. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 257, p. 198-207, 1982.
- TENGGU-MUHAMMAD, T.S., CRYER, A., RAMJI, D.P. Synergism between interferon gamma and tumour necrosis factor alpha in the regulation of lipoprotein lipase in the macrophage J774.2 cell line. **Cytokine**, Wales Cardiff, v. 10, n.1, p. 38-48, 1998.
- THOMPSON, M.P., COOPER, S.T., PARRY, B. R., TUCKEY, J.A. Increased expression of the mRNA for hormone-sensitive lipase in adipose tissue of cancer patients. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1180, p. 236-242, 1993.
- THOMPSON, M.P., KOONS, J.E., TAN, E.T.H., GRIGOR, M.R. Modified lipoprotein lipase activities, rates of lipogenesis, and lipolysis as factor leading to lipid depletion in C57BL mice bearing the preputial gland tumor ESR-586. **Cancer Res.**, Baltimore, v. 41, p. 3228-3232, 1981.
- TOZUKA, M., YAMAUCHI, K., HIDAKA, H., NAKABAYASHI, T., OKUMURA, N., KATSUYAMA, T. Characterization of hypertriglyceridemia induced by L-

- asparaginase therapy for acute lymphoblastic leukemia and malignant lymphoma. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, Philadelphia, v. 27, n.5, p. 351-357, 1997.
- TURLEY, S.D., ANDERSEN, J.M., DIETSCHY, J.M. Rates of sterol synthesis and uptake in the major organs of the rat in vivo. **J. Lipid Res.**, Bethesda, v, 22, p. 551-568, 1981.
- UTERMANN, G., WEBER, W. Protein composition of Lp(a) lipoprotein from human plasma. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.154, p. 357-361, 1983.
- WANG, C.S., McCONATHY, W.J., KLOER, H.U., ALAUPOVIC, P. Modulation of lipoprotein lipase activity by apolipoproteins. Effect of apolipoprotein C-III. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 75, p. 384-390, 1985.
- WION, K.L., KIRCHGESSNER, T.G., LUSIS, A.J., SCHOTZ, M.C., LAWN, R. N. Human lipoprotein lipase complementary DNA sequence. **Science**, Washington, v. 235, p. 1638-1641, 1987.
- YEN, F.T., DECLELBAUM, R.J., MANN, C.J., MARCEL, Y.L., MILNE, R. W., TALL, A.R. Inhibition of cholesterol ester transfer protein activity by monoclonal antibody. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 83, p. 2018-2024, 1989.
- YOUNES, R.N., VYDELINGUM, N.A., NOGUCHI, Y., BRENNAN, M. F. Lipid kinetic alterations in tumor-bearing rats: reversal by tumor excision. **J. Surg. Res.**, New York, v. 48, p. 324-328, 1990.
- ZANNIS, V.I. Molecular biology of human apolipoproteins B and E and associated diseases of lipoprotein metabolism. **Adv. Lipid Res.**, New York, v. 23, p.1-61, 1989.
- ZANNIS, V.I., KARDASSIS, D., ZANNIS, E. E. Genetic mutations affecting human lipoproteins, their receptors, and their enzymes. **Adv. Hum. Genet.**, New York, v. 21, p.145-319, 1993.
- ZECHNER, R.T., NEWMAN, B., SHERRY, B., CERAMI, A., BRESLOW, J. L. Recombinant human cachetin/tumor necrosis factor but not interleukin-1a down regulates lipoprotein lipase gene expression at the transcriptional level mouse 3T3-L1 adipocytes. **Mol. Cell. Biol.**, Washington, v. 8, p. 2394-2401, 1988.
- ZILVERSMIT, D.B., DAVIS, A.K. Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic precipitation. **J. Lab. Clin. Med.**, ST. Louis, v. 31, p. 155-160, 1950.

ZLTKIS, A., ZAK, B. Study of new cholesterol reagent. **Anal. Biochem.**, New York, v. 29, p. 143-148,1969.

Endereço para correspondência

Professora Romélia Pinheiro Gonçalves

Rua Bento Albuquerque, 1190 apto. 402

CEP:60190-080 Fortaleza-Ceará/ Fone(085)2340178/9966629.

Artigo de Revisão

Diagnóstico Laboratorial da *Cyclospora cayetanensis*

Laboratory Diagnosis of *Cyclospora cayetanensis*

Geraldo Attilio De Carli*

RESUMO - *Cyclospora cayetanensis*, coccídio protista, é um protozoário patogênico para o homem. A ciclosporose é caracterizada por moderada à severa fadiga, náuseas, anorexia, mialgia, perda de peso e intensa diarreia. Durante os últimos anos, a ciclosporose tem sido descrita em vários surtos de diarreia na América Central e América do Sul, no Caribe, África, Bangladesh, no sul e oeste da Ásia, Austrália, Inglaterra e Europa oriental. As rotas de transmissão ainda são desconhecidas, entretanto, provavelmente a principal é a fecal-oral, como, também, diretamente ou via água. O mais recente surto de ciclosporose nos Estados Unidos da América do Norte sugere a transmissão de *Cycl. cayetanensis* pela ingestão de frutas frescas contaminadas e importadas da América Central. Devido às limitações do exame microscópico de preparações a fresco, vários métodos de coloração favorecem o diagnóstico de *Cycl. cayetanensis*. Os oocistos de *Cyclospora* são diagnosticados pela coloração de preparações fixadas e coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen, pela safranina modificada, pela autofluorescência (ação da luz ultravioleta - UV) e pela utilização da reação em cadeia da polimerase (PCR). As variações da coloração de Ziehl-Neelsen não são tão eficazes para essa espécie como para os outros coccídios intestinais (*Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*). A *Cycl. cayetanensis* exibe uma alta variabilidade de coloração e alguns oocistos não são visualizados. Entretanto foram obtidas colorações uniformes dos oocistos desse organismo pela modificação do método da safranina pelo aquecimento no forno de microondas. Os oocistos não são esporulados quando excretados nas fezes. Cada oocisto esporulado contém dois esporocistos e cada esporocisto contém dois esporozoítos.

UNITERMOS – *Cyclospora cayetanensis*, coccídio, diagnóstico de laboratório, forno de microondas.

ABSTRACT– *Cyclospora* outbreaks have been associated with foodborne spread. Food items associated with clinical disease have included seasonal production, particularly fresh fruits. However, waterborne spread of this organism is also likely. The laboratory diagnosis of newly recognized infectious agent, such as *Cyclospora cayetanensis* is frequently problematic, because techniques and methods are not available. The methods currently accessible for diagnosis are described and compared including modified acid-fast staining, autofluorescence, and amplification by the polymerase chain reaction (PCR). The modified acid-fast is not as effective for this species as for other intestinal coccidians (*Cryptosporidium parvum* e *Isospora belli*).

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

This organism exhibits a highly variable staining reaction, and some oocysts will not be visualized. However, it was reported a uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating.

UNITERMS - *Cyclospora cayetanensis*, coccidia, laboratory diagnosis, microwave.

INTRODUÇÃO

Os ciclosporídeos, provavelmente, foram descritos pela primeira vez em 1870 por Eimer no intestino de toupeiras¹³; entretanto o gênero foi criado em 1881 por Schneider²⁸. A primeira publicação sobre infecções referentes a *Cyclospora cayetanensis* foi descrita por Ashford (1979)² que a identificou como *Isospora* tipo coccídio nas fezes de três indivíduos em Papua, Nova Guiné. Em 1989, Narango et al.²¹ descreveram o mesmo organismo em peruanos com diarreia crônica e relataram o organismo como um coccídio tipo *Cryptosporidium parvum*. Alguns investigadores suspeitavam que os oocistos da *Cycl. cayetanensis* não esporulados eram semelhantes à cianobactéria e a denominaram como “organismo tipo cianobactéria” (CLB) porque a CLB era citada com grande frequência na literatura. Ortega et al. (1992)²² mostraram, em uma comunicação breve, que os oocistos desse organismo eram esporulados e excistados, resultando dessa descrição a colocação do parasito no gênero *Cyclospora*. A espécie *Cycl. cayetanensis* também foi criada nesse mesmo ano. A partir de 1985, começaram a ser descritos com grande frequência, através do mundo, organismos com tamanho de aproximadamente 8 a 10 µm de diâmetro, apresentando coloração usualmente do rosa ao púrpura, pela coloração de preparações fixadas e coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen^{9,10,11} e autofluorescência quando submetidos à luz ultravioleta (UV)⁶. Os oocistos de *Cycl. cayetanensis* assemelham-se aos oocistos do *C. parvum*, mas não apresentam morfologia interna bem definida e a intensidade de cor tende ser mais variável (variabilidade de coloração) do que aquela vista no *Cryptosporidium* e na *Isospora*.

Entretanto, como as informações morfológicas não foram apresentadas na comunicação de Ortega et al. (1992)²², a *Cycl. cayetanensis* tecnicamente tornou-se *nomen nudum* (nome de espécie sem a descrição). Em 1993, Ortega et al.²³ apresentaram descrições adicionais sobre esse novo coccídio e, em 1994, Ortega et al.²⁴ publicaram uma completa descrição morfológica do parasito, validando o nome do coccídio. Dessa maneira, o nome correto para esse parasito é *Cyclospora cayetanensis* Ortega, Gilman e Sterling, 1994 e a etimologia do *nomen triviale* foi derivada da Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Peru, onde inicialmente o parasito foi estudado²⁵.

Pacientes com SIDA podem ser infectados pela *Cycl. cayetanensis*^{25,30}. Estudos baseados em evidências histológicas mostraram a possibilidade de que os pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) têm em hospedar um número maior de parasitos do que os indivíduos imunocompetentes infectados com o mesmo organismo. Pesquisas realizadas com pacientes infectados pela SIDA em Lima, Peru, mostraram que somente 1% dos 126 doentes que apresentavam diarreia estavam infectados com *Cyclospora*²⁵. Resultados semelhantes com pacientes sidéticos foram observados nos Estados Unidos da América do Norte e Europa. Provavelmente, esse fato é devido ao uso freqüente do sulfametoxazol+trimetoprima (TMP-SMX) (Bactrim®, Deptra® ou Cotrim®) para a

profilaxia do *Pneumocystis carinii*. A alta prevalência de *Cycl. cayetanensis* em pacientes com SIDA no Haiti é o resultado do uso restrito do TMP-SMX na profilaxia do fungo²⁵.

A ciclosporose é caracterizada por moderada à severa fadiga, náuseas, anorexia, mialgia, perda de peso e intensa diarreia, com 1 a 8 evacuações diárias por 1 a 3 semanas. A diarreia usualmente é intermitente, mas autolimitada e em pacientes imunocompetentes as evacuações variam de 4 a 107 dias. Os sintomas se manifestam, geralmente, uma semana após a ingestão dos oocistos, podendo persistir por meses. O intestino delgado apresenta inflamação e o parasita causa mudanças na mucosa, incluindo atrofia das vilosidades e hiperplasia das criptas intestinais. Infecções moderadas produzem poucos ou nenhum sinal clínico^{11,16,18,20,25}.

DIAGNÓSTICO DE LABORATÓRIO

O diagnóstico das infecções pela *Cyclospora* em espécimes fecais é realizado pela observação e identificação microscópica dos organismos (oocistos) ou de seu DNA, através dos mesmos procedimentos indicados para o estudo de outros parasitos intestinais. Na realidade, a identificação segura e correta do parasito depende de critérios morfológicos, os quais estão sujeitos a uma colheita bem-feita e a uma boa preservação dos espécimes fecais. Não pode ser esquecido que um material fecal inadequadamente colhido, velho ou mal preservado será de pequeno valor para o diagnóstico. A detecção microscópica dos oocistos nas fezes é considerada como um procedimento padrão para o diagnóstico (*gold standard*) e provavelmente em um futuro próximo a microscopia ainda permaneça como o método de escolha para a determinação das infecções causadas por esse pequeno coccídio^{5,6,11,12}.

Os oocistos da *Cycl. cayetanensis* são excretados intermitentemente, esporadicamente e raramente em pequeno número; conseqüentemente, algumas técnicas para concentrar oocistos têm sido usadas com freqüência como parte da rotina dos procedimentos de diagnóstico^{5,6,11,12}. Inicialmente, devido às limitações do exame microscópico de preparações a fresco e pelo desconhecimento da morfologia dos oocistos, os métodos de coloração favoreceram o diagnóstico da *Cycl. cayetanensis*^{5,12}. Atualmente, como os pesquisadores e os parasitologistas começaram a ganhar mais experiência e familiaridade com esse emergente organismo, o uso de preparações a fresco, não coradas, tem sido empregado significativamente no diagnóstico dessa infecção^{5,12}.

O exame microscópico direto a fresco de esfregaços ou de preparações fixadas e coradas pelos métodos derivados de Ziehl-Neelsen são procedimentos simples e eficientes para o exame das fezes^{5,8,10,12}. Entretanto, quando o número de oocistos é muito baixo, técnicas de concentração são recomendadas, antes do estudo das preparações coradas. A técnica de concentração centrífugo-sedimentação pela formalina-acetato de etila^{9,14,15,16,17,18} é rotineiramente usada, mostrando-se eficiente para a pesquisa de *Cyclospora*. Os procedimentos de flutuação também são indicados para separar os oocistos de *Cycl. cayetanensis*. Esses métodos usam reagentes de alta densidade para a concentração dos oocistos, como o sulfato zinco, solução concentrada de cloreto de sódio e solução de sacarose. A densidade específica dessas soluções é de aproximadamente 1,2 g/ml. As vantagens e desvantagens das técnicas de flutuação foram exaustivamente discutidas^{9,18}. A alta densidade dos reagentes é a mais significativa desvantagem dos procedimentos de flutuação. A técnica de Sheather é indicada para a pesquisa de oocistos em material fecal fresco^{9,18}. Os oocistos com muita freqüência entram em colapso e os parasitas tornam-se distorcidos na aparência,

dificultando a identificação. Visverara *et al.* (1997)³² descreveram um novo método baseado na coloração da safranina^{3,32}, o qual cora uniformemente os oocistos da *Cyclospora* em brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo azul (azul de metileno) ou verde (verde de malaquita), desde que os esfregaços fecais sejam aquecidos no forno de microondas antes da coloração. Esse procedimento de coloração modificado é rápido, seguro e fácil de realizar. Os autores o consideram superior às colorações derivadas de Ziehl-Neelsen^{7,12,19,32}.

Outros procedimentos são usados e indicados para o diagnóstico da ciclosporoze, como a esporulação¹², diagnóstico molecular (detecção baseada no PCR)^{12,27} e identificação histológica pela biópsia do intestino^{12,25}.

Colheita e Preservação da Amostra: Os mesmos protocolos, procedimentos e medidas de segurança desenvolvidos para os espécimes fecais coletados para o diagnóstico de outras parasitoses intestinais são aplicados para a *Cyclospora*^{9,17,18,20,31}. Os espécimes não preservados podem ser temporariamente refrigerados (3 a 5°C) e imediatamente após enviados ao laboratório.

Para permitir um exame microscópico satisfatório, todo o bolo fecal deve ser enviado ao laboratório. Essa conduta não somente abastece o laboratório com suficiente material para a realização de vários métodos e técnicas, como permite ao analista selecionar uma porção específica para o exame. Na pesquisa de oocistos de *Cycl. cayetanensis*, as fezes podem ser examinadas frescas ou preservadas na solução de formaldeído a 10%⁹. Outra porção da amostra pode ser emulsificada na solução de bicromato de potássio a 2,5% (m/v). Essa solução não é preservadora, entretanto é usada na rotina como um meio de armazenamento e de manutenção da viabilidade dos oocistos. A solução de formaldeído a 10% apresenta a vantagem de preservar os oocistos, destruir o seu poder patogênico e inativar outros agentes infecciosos. Uma terceira amostra não preservada deverá ser congelada. Essa amostra permite o armazenamento por um longo período de tempo^{12,32}, a realização de diferentes avaliações e principalmente estudos baseados na biologia molecular (reação em cadeia da polimerase - PCR), os quais não poderiam ser realizados com amostras fecais formolizadas^{12,27}. As amostras preservadas na solução de formaldeído a 10% são indicadas para o exame microscópico direto, para as técnicas de concentração e na preparação de esfregaços permanentes corados.

A possibilidade de encontrar oocistos aumenta pelo exame de amostras múltiplas em intervalos de 2 a 3 dias. As amostras fecais são freqüentemente preservadas pelo acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF) e pelo fixador álcool-polivinílico (fixador APV)⁹. Os métodos de coloração derivados de Ziehl-Neelsen e as técnicas de concentração de oocistos não são recomendados para amostras fecais preservadas pelo fixador APV. O material preservado pelo SAF pode ser trabalhado de forma idêntica às fezes preservadas pela solução de formaldeído a 10%. O sedimento fecal deve ser lavado para poder ser estudado pelo exame de esfregaços a fresco e através de preparações fixadas e coradas.

Exame Direto a Fresco: Os oocistos não são esporulados quando excretados nas fezes, eles necessitam de uma a duas semanas em condições ideais de temperatura para se tornarem esporulados. Os oocistos esporulados são arredondados, com 8 a 10 µm de diâmetro (variando entre 7,7 e 10 µm)¹. Cada oocisto esporulado possui dois esporocistos ovais (4,0 x 6,3 µm), e cada esporocisto apresenta dois esporozoítos (1,2 x 9,0 µm)^{1,25}. Os oocistos

possuem uma evidente e bem definida parede cística. Os oocistos mostram internamente agrupamentos de glóbulos refráteis, rodeados por uma membrana espessa. Esses glóbulos internos coram-se de castanho pela solução de iodo. Os oocistos da *Cyclospora* são duas vezes maiores em tamanho do que os estágios de diagnóstico de *C. parvum* (arredondados, esféricos ou ovais, com 4 a 5 µm de diâmetro) e um terço menores do que a *I. belli* (elipsóides, 20 a 30 x 10 a 19 µm). A morfometria com o micrômetro ocular é indispensável para a identificação das espécies^{8,25}.

A demonstração dos oocistos pelo exame direto a fresco é aumentada ou intensificada pela microscopia de epifluorescência⁴. Os oocistos exibem marcada autofluorescência, a qual é facilmente observada pelo microscopista^{4,12,18}. A autofluorescência dos oocistos de *C. parvum* é tão tênue, que não apresenta valor no diagnóstico desse coccídio. Entretanto os oocistos de *I. belli* apresentam uma brilhante e visível autofluorescência^{1,4,18}. Os oocistos da *Cyclospora* autofluorescem em verde forte (filtro de excitação de 450 a 490 DM) ou em azul intenso (filtro de excitação de 365 DM) quando submetidos à ação da luz ultravioleta (UV). A fluorescência inespecífica é reduzida pela adição de uma gota de solução de iodo de D' Antoni antes do exame. As amostras fecais frescas fixadas pelo álcool metílico ou preservadas pelo SAF são usadas na microscopia de fluorescência pela luz ultravioleta (UV)^{1,4,14,18,31}.

Esfregaços Permanentes Corados: Devido às limitações do exame microscópico de preparações a fresco, vários métodos de coloração favorecem o diagnóstico dos oocistos dos coccídios. Essas preparações proporcionam ao parasitologista um registro permanente do protozoário identificado, podendo ser usadas para estudos com especialistas quando forem observadas características morfológicas que diferem das comuns. Existem vários procedimentos de coloração. Em geral, os melhores são aqueles em que o parasito é corado (variações da coloração de Ziehl-Neelsen), os quais se sobrepõem àqueles em que os oocistos da *Cycl. cayetanensis* aparecem em contraste^{9,11,18,31}.

Curiosa e inexplicavelmente, a *Cyclospora* exibe uma marcada variabilidade de coloração quando corada pelos derivados de Ziehl-Neelsen. Os oocistos coram-se do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso sobre um fundo azul de intensidade de cor variável. Entretanto os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida, mostrando intensidade de cor variável. Essa variabilidade de coloração deixa de ser um problema nas infecções maciças, porque sempre serão observados vários oocistos corados.

Foram relatados casos em que todos os oocistos presentes no esfregaço fecal não foram corados^{1,12,18}. Os oocistos em preparações coradas pelos derivados de Ziehl-Neelsen são uniformes no tamanho, permanecendo com a mesma grandeza como foram descritos no exame direto a fresco. Entretanto, com mais frequência do que nas preparações a fresco, os oocistos não são perfeitamente arredondados. A parede dos oocistos apresenta uma típica aparência rugosa ou ondulada e colapso ou distorção em um ou em vários lados^{12,18}.

Dependendo do grau de coloração, os oocistos podem variar em cor, desde organismos incolores ou de coloração vermelha clara, a um intenso e brilhante púrpura avermelhado. Essa variabilidade na intensidade de coloração, apesar de ser uma das características da *Cyclospora*, tem indubitavelmente levado a muitos erros no diagnóstico de laboratório⁷. Na coloração da hematoxilina férrica modificada pela incorporação do corante de Kinyoun (solução de fucsina-

fenicada), os oocistos da *Cycl. cayetanensis* aparecem arredondados de coloração rosa ao vermelho púrpura sobre um fundo cinza da preparação^{1,26,29}.

A coloração da safranina desenvolvida para a identificação de oocistos de *Cryptosporidium* em esfregaços fecais foi modificada pela inclusão do aquecimento em forno de microondas^{3,19,32}. A inclusão do aquecimento em forno de microondas ao procedimento de coloração resultou em uma coloração uniforme dos oocistos. Esse procedimento de coloração não é somente superior às colorações derivadas de Ziehl-Neelsen, mas é mais rápido, seguro e de fácil realização. Os oocistos da *Cyclospora* corados pela safranina modificada exibem as seguintes características: tamanho de 8 a 10 µm de diâmetro, parede rugosa e a coloração varia do vermelho a um brilhante vermelho-alaranjado. A parede dos oocistos permanece autofluorescente, sendo mais evidente quando é observada pelo microscópio de contraste diferencial de interferência (DIC ou Nomarsky)¹².

1. Método da Safranina modificada

Coloração de oocistos de *Cyclospora cayetanensis*^{3,32}
(Baxby, Blundell & Hart, 1984; Visvevara et al., 1997)

O método de coloração da safranina modificada cora os oocistos da *Cycl. cayetanensis* uniformemente em um brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo azul (azul de metileno) ou verde (verde de malaquita), desde que os esfregaços fecais sejam aquecidos no forno de microondas antes da coloração. Esse procedimento de coloração é rápido, seguro e fácil de realizar.

Amostra

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

Reagentes

1. Safranina (CI 50240 ou Merck)
2. Azul de metileno (CI 42780)
3. Verde de malaquita (CI 42000)
4. Citrato de sódio, cristais $[C_3H_4OH(COONa)_3 \cdot 5H_2O]$

Soluções

1. Solução aquosa de safranina a 1% (m/vol) (pH 6,5)
2. Solução aquosa de azul de metileno a 1% ou solução aquosa de verde de malaquita a 1% (m/vol).

Coloração da Amostra

Usar luvas durante todas as etapas da coloração

1. Preparar o esfregaço, colocando em lâminas de microscopia uma gota (50 µl) de suspensão de fezes frescas ou formolizadas.
2. Deixar secar à temperatura ambiente.
3. Após, mergulhar as lâminas na solução aquosa de safranina a 1% e aquecer no forno de microondas, com potência total (650 W) por 30 segundos. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
4. Lavar com água corrente por 30 segundos.
5. Corar o fundo da preparação mergulhando as lâminas na solução aquosa de azul de metileno a 1% ou na solução aquosa de verde de malaquita por 1 minuto. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
6. Lavar com água corrente por 30 segundos e secar.
7. Fazer a montagem com resina sintética.

Características da Coloração

Os oocistos aparecem arredondados com 8 a 10 µm, uniformemente corados em um brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo azul (azul de metileno) ou verde (verde de malaquita).

Observações

1. O procedimento original de Baxby *et al.*³ não cora com regularidade os oocistos de *Cyclospora*. O aquecimento na chama do bico de Bunsen não é uniforme, com frequência, devido à evaporação, o corante que cobre o esfregaço seca, deixando ocultos resíduos de cristais, os quais interferem na coloração do oocisto^{12,19}. O aquecimento dos esfregaços em banho de água a 60°C também não mostrou bons resultados.
2. Quando o esfregaço é aquecido no forno de microondas, depois de ter sido coberto pela solução aquosa de safranina (água destilada acidificada em pH 2,5 ou pH 6,5 ou em tampão de citrato), é observada uma coloração uniforme nos oocistos. O exato modo de ação do aquecimento no forno de microondas não é conhecido. Entretanto alguns autores supõem que as ligações cruzadas das proteínas (*cross-linking of proteins*) poderiam ser alteradas pelo aquecimento no forno de microondas, ou existiria a possibilidade de o calor modificar a configuração da superfície dos oocistos, tornado a membrana permeável, favorecendo a penetração uniforme do corante safranina^{19,32}.
3. Visvesvara *et al.*³² obtiveram excelentes resultados na identificação da *Cyclospora* preservando a amostra fecal em formaldeído a 10%, corando os esfregaços pela safranina a 1% (pH 6,5) e o fundo da preparação com verde de malaquita a 1% (safranina-verde de malaquita). Esfregaços individuais mergulhados na solução de safranina são aquecidos por 30 segundos no forno de microondas, enquanto que grupos de 5 a 10 esfregaços mergulhados na solução corante na cuba de Coplin são aquecidos por 1 minuto.

4. As amostras fecais armazenadas na solução de bicromato de potássio a 2,5% não mostram resultados de coloração uniforme. Entretanto, quando o preservador é removido pela lavagem com solução salina tamponada e após fixadas em solução de formaldeído a 10%, os oocistos corados pela safranina apresentam uma coloração uniforme.
5. Para a obtenção de ótimos resultados na coloração, a solução corante de safranina deve ser trocada após 10 ciclos de coloração.
6. Quando os oocistos são corados pelo método de Giemsa, os organismos aparecem arredondados, de coloração azul tênue. Certos organismos não ficam corados e são dificilmente identificados. As leveduras e outros artefatos das fezes, com o mesmo tamanho, coram-se em azul. Os organismos não são corados pelos métodos do tricrômio, do *chromotrope* e do *Gram-cromotrope*³².
7. O congelamento das amostras fecais a -20° C não altera as propriedades de coloração dos oocistos, os quais são corados em brilhante vermelho-alaranjado, como os organismos que não foram congelados¹².

Coloração de oocistos de *Cryptosporidium parvum*^{3,32}
(Baxby, Blundell & Hart, 1984; Visvevara *et al.*, 1997)

A coloração da safranina modificada por Visvesvara *et al.*, 1997 é indicada para a coloração de oocistos de *C. parvum*.

Amostra

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

Reagentes

1. Ácido clorídrico (HCl)
2. Álcool metílico (CH₄O)
3. Safranina (CI 50240 ou Merck)
4. Azul de metileno (CI 42780)
5. Verde de malaquita (CI 42000)

Soluções

1. Solução aquosa ácida de safranina a 1% e (pH 6,5) (m/vol)
2. Solução aquosa de azul de metileno a 1% ou solução aquosa de verde de malaquita a 1% (m/vol).
3. Solução alécoolica de ácido clorídrico a 3% (v/v)

Ácido clorídrico
Álcool metílico

3 ml
100 ml

Coloração da Amostra

1. Preparar o esfregaço colocando em lâminas de microscopia uma gota (50 µl) de suspensão de fezes frescas ou formolizadas.
2. Secar o esfregaço à temperatura de ~60°C (aquecedor de lâmina).
3. Antes de corar, deixar o esfregaço esfriar à temperatura ambiente.
4. Mergulhar na solução ácido-álcool a 3% por 5 minutos. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
5. Lavar com água corrente.
6. Após, mergulhar as lâminas na solução aquosa de safranina a 1% e aquecer no forno de microondas, com potência total (650 W) por 1 minuto. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
7. Lavar com água corrente.
8. Corar o fundo da preparação mergulhando as lâminas na solução aquosa de azul de metileno a 1% ou na solução aquosa de verde de malaquita por 1 minuto. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
9. Lavar com água corrente e secar
10. Fazer a montagem com resina sintética

2. Método de Kinyoun modificado (a frio)^{8,9,10,31,32}

O método de Kinyoun modificado (a frio) não requer o aquecimento da fucsina-fenicada usada na coloração.

Amostra

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

Reagentes

1. Álcool metílico (CH₄O)
2. Álcool etílico (C₂H₆O)
3. Fenol, (fundido a 44° C) (C₆H₆O)
4. Fucsina básica (CI 42500)
5. Ácido sulfúrico, concentrado (H₂SO₄)
6. Azul de metileno (CI 42780)
7. Hidróxido de potássio (KOH)

Preparação das Soluções

1. Corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenicada)

a. Solução A

Fucsina básica	4 g
Álcool etílico a 95% (v/v)	20 ml

b. Solução B

Fenol, fundido a 44°C	8 g
Água destilada-deionizada q.s.p.	100 ml

c. Solução Corante

Solução A	20 ml
Solução B	100 ml

- Misturar as soluções A e B e armazenar à temperatura ambiente até o momento do uso. Estável por 1 ano.

ou

Fucsina básica	4 g
Fenol, fundido a 44°C	8 ml
Álcool etílico a 95% (v/v)	20 ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	100 ml

- Dissolver a fucsina básica no álcool etílico e adicionar a água destilada lentamente com agitação. Adicionar 8 ml de fenol ao corante, com uma pipeta com bulbo de borracha.

2. Solução de álcool etílico a 50% (v/v).

3. Solução aquosa de ácido sulfúrico a 1%.

Armazenar à temperatura ambiente. Estável por 1 ano.

4. Solução alcóolica (álcool etílico a 95%) de azul de metileno a 0,3%.

ou

5. Solução alcalina de azul de metileno (solução de Loeffler)

Azul de metileno	0,3 g
Álcool etílico a 95% (etanol)	100 ml
Hidróxido de potássio (KOH), (0,01%)	100 ml

Observação

Armazenar à temperatura ambiente. Estável por 1 ano.

Coloração da Amostra

Usar luvas durante as etapas da coloração

1. Preparar o esfregaço com fezes frescas ou preservadas. As amostras fecais formolizadas poderão ser concentradas pela centrifugação (500 x g por 10 minutos).
2. Deixar secar à temperatura ambiente.
3. Fixar com álcool metílico por 1 minuto e deixar secar à temperatura ambiente.
4. Corar com o corante de Kinyoun (a frio) por 3 a 5 minutos. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
5. Escorrer o corante e lavar com solução aquosa de álcool etílico a 50% (3 a 5 segundos).
6. Lavar com água corrente.
7. Diferenciar com solução aquosa de ácido sulfúrico a 1% por 2 minutos ou até que o corante cesse de escorrer da lâmina.
8. Lavar com água corrente. Deixar escorrer.
9. Corar o fundo da preparação com solução alcoólica de azul de metileno a 0,3% por 1 minuto. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
10. Lavar com água corrente e secar.
11. Fazer a montagem com resina sintética

Características da Coloração

Os oocistos da *Cycl. cayetanensis* apresentam coloração do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso. O fundo da preparação é corado em azul. Os oocistos de *Cycl. cayetanensis*, com tamanho de 8 a 10 μm de diâmetro assemelham-se ao *C. parvum*; e não apresentam morfologia interna bem definida, e a intensidade de cor tende ser mais variável do que aquela vista no *Cryptosporidium* e na *Isospora*.

Observações

1. As colorações (soluções de iodo) usadas no exame parasitológico das fezes não são indicadas para corar oocistos, como também a coloração da hematoxilina fêrrica e do tricrômio não são procedimentos seguros e recomendados. A modificação da coloração de Kinyoun (a frio) não é indicada para corar amostras fecais preservadas pelo fixador APV. Entretanto amostras fecais preservadas com o SAF apresentam ótimos resultados nos processos de coloração. Os esfregaços devem ser finos, pois esfregaços espessos não são convenientemente descorados.
2. As técnicas de concentração de rotina (formalina-éter ou formalina acetato de etila) podem ser usadas para isolar oocistos de *Cyclospora*.
3. Após a etapa 3, é aconselhável aquecer os esfregaços fixados a 70°C por 10 minutos (aquecedor de lâmina). Algumas amostras fecais, devido a sua consistência mucóide, requerem o tratamento com hidróxido de potássio (KOH) a 10%. (Adicionar 10 gotas de KOH a 10% ao sedimento fecal e agitar até a total homogeneização. Lavar com solução de formaldeído a 10% e centrifugar (500 x g por 10 min). Sem decantar o sobrenadante, tomar 1 gota do sedimento e preparar um esfregaço fino). A possibilidade de encontrar oocistos

umenta pelo exame de amostras fecais múltiplas, em razão da intermitência da passagem destes organismos a partir dos hospedeiros. Alguns autores recomendam, no mínimo, a colheita de três amostras em dias alternados. Normalmente são usadas concentrações fracas de ácido sulfúrico (1 a 3%). Concentrações fortes do ácido removem demasiadamente o corante. As amostras fecais devem ser centrifugadas em tubos com tampa de rosca.

4. A coloração dos organismos ácido-resistentes pode ser acelerada, pela adição de um detergente ou de um agente anti-umidade. O tergitol n° 7 (Sigma Chemical Co.) é indicado para essa modificação da coloração. Adicionar 1 gota de tergitol n° 7 para cada 30 a 40 ml do corante de Kinyoun. A coloração de fundo da preparação depende do corante usado; azul de metileno concede a cor azul aos organismos que não se coram pela fucsina-fenicada; enquanto que o verde malaquita cora o fundo em verde e o ácido pícrico em amarelo. A concentração do material fecal é essencial para a demonstração dos organismos.

3. Método de Ziehl-Neelsen modificado (a quente)^{8,9,10,31}

O método de Ziehl-Neelsen modificado requer o aquecimento da fucsina-fenicada usada na coloração.

Amostra

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

Reagentes

1. Álcool etílico (C₂H₆O)
2. Fenol fundido a 44°C (C₆H₆O)
3. Fucsina básica (CI 42500)
4. Ácido sulfúrico, concentrado (H₂SO₄)
5. Azul de metileno (CI 42780)

Preparação das Soluções

1. Solução de fucsina-fenicada

- a. Solução A

Fucsina básica	0,3 g
Álcool etílico a 95% (v/v)	10 ml

- b. Solução B

Fenol (fundido a 44°C)	5 g
Água destilada-deionizada q.s.p.	100 ml

c. Solução Corante

- Misturar as soluções A e B e armazenar à temperatura ambiente até o momento do uso. Estável por 1 ano.

2. Solução aquosa de ácido sulfúrico a 5%.
3. Solução aquosa de azul de metileno a 0,3%.

Coloração da Amostra

Usar luvas durante todas as etapas da coloração

1. Preparar o esfregaço com fezes frescas ou preservadas.
2. Deixar secar à temperatura ambiente ou pelo aquecimento.
3. Corar com fucsina-fenicada, aquecendo a lâmina até a emissão de vapores por 5 minutos. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
4. Escorrer o corante e lavar com água corrente.
5. Diferenciar com solução aquosa de ácido sulfúrico a 5% por 30 segundos.
6. Lavar com água corrente. Drenar.
7. Corar o fundo com solução de azul de metileno a 0,3% por 1 minuto. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
8. Lavar com água corrente e secar.
9. Fazer a montagem com resina sintética

Características da Coloração

Os oocistos da *Cycl. cayetanensis*, com tamanho de 8 a 10 μm , assemelham-se ao *C. parvum*, não apresentando os oocistos morfologia interna bem definida, e a intensidade de cor tende a ser mais variável do que aquela vista no *Cryptosporidium* e na *Isospora*.

Observações

1. Não deixar o corante ferver e secar durante o processo de coloração. Aquecer a lâmina até a emissão de vapores.
2. Após a etapa 2, é aconselhável aquecer os esfregaços fixados a 70° C por 10 minutos (em aquecedor de lâmina). Poderão ser usadas diferentes concentrações de ácido sulfúrico (0,25 a 10%), entretanto o tempo de diferenciação varia de acordo com a concentração usada. Habitualmente, são empregadas soluções de 1 a 5% de H₂SO₄. Ver observações referentes ao método modificado de Kinyoun.

Controle de Qualidade

1. Incluir junto ao método de coloração uma lâmina controle com *C. parvum*, preparada com amostra fecal preservada pela solução salina de formaldeído a 10%. Quando os oocistos do

Cryptosporidium apresentarem uma boa coloração, os organismos *Cycl. cayetanensis* (8 a 10 μm) também tomarão o corante.

2. Os oocistos do *C. parvum* apresentam coloração do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso, com diâmetro de aproximadamente 4 a 5 μm , com quatro esporozoítos internos.. O fundo da preparação é corado em azul.
3. Conferir a aderência (macroscopicamente) dos espécimes à lâmina.
4. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópico durante a calibração. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.
5. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessário, seguir o plano de ação para resultados “fora do controle”.

4. Coloração pela Hematoxilina modificada^{26,29}

Esse método de coloração foi desenvolvido para amostras fecais preservadas com o fixador acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF). O método de coloração pela hematoxilina férrica modificada pela incorporação do corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenicada) é uma tentativa de apresentar um procedimento simultâneo de coloração para trofozoítos, cistos e oocistos. A combinação do corante hematoxilina férrica, com o material preservado pela solução fixadora SAF e com o corante de Ziehl-Neelsen modificado, resultou em um método com muito bom rendimento, indicado para o diagnóstico da espécie *Cycl. cayetanensis*.

Amostra

Material fecal preservado em SAF. Os espécimes frescos poderão ser corados após a fixação (30 minutos) em SAF.

Reagentes

1. Claras de ovos de galinha
2. Glicerina ($\text{C}_2\text{H}_8\text{O}_3$)
3. Salicilato de sódio ($\text{C}_7\text{H}_5\text{O}_3\text{Na}$) ou tímolo ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}$) ou tintura de mertiolato (1:10.000) ou formaldeído 37-40% (HCHO) (1:100)
4. Acetato de sódio ($\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
5. Ácido acético glacial ($\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$)
6. Formaldeído 37-40% (HCHO)
7. Álcool etílico absoluto ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$)
8. Álcool etílico a 70%, 95% (v/v)
9. Ácido clorídrico concentrado (HCl)
10. Corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenicada)
11. Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290)
12. Ácido pícrico [$\text{C}_6\text{H}_2(\text{OH})(\text{NO}_2)_3$] (CI 10305)
12. Sulfato ferroso amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$]
13. Sulfato férrico amoniacal [$\text{Fe}(\text{NH}_4)(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$]

14. Xilol (Xileno) (C₈H₁₀) ou Toluol (Tolueno) (C₇H₈)**Preparação das Soluções**

1. Corante de Kinyoun (solução de fucsina-fenicada)

Fucsina básica	4 g
Fenol, fundido a 44°C	8 ml
Álcool etílico a 95% (v/v)	20 ml
Água destilada-deionizada q.s.p.	100 ml

- Dissolver a fucsina básica no álcool etílico e adicionar a água destilada lentamente com agitação. Adicionar 8 ml de fenol ao corante, com uma pipeta com bulbo de borracha.

2. Solução corante de Hematoxilina férrica de Spencer & Monroe

Solução I

Hematoxilina, forma cristalina (CI 75290)	10 g
Álcool etílico absoluto (C ₂ H ₆ O)	1.000 ml

- Dissolver a hematoxilina no álcool etílico absoluto. Estocar em frasco de vidro de cor âmbar. Deixar amadurecer durante 6 meses ou durante 1 semana exposto ao sol.

Solução II

Sulfato ferroso amoniacal [Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ .6H ₂ O]	10 g
Sulfato férrico amoniacal [FeNH ₄ (SO ₄) ₂ .12H ₂ O]	10 g
Ácido clorídrico concentrado (HCl)	10 ml
Água destilada-deionizada	1.000 ml

Solução de trabalho

- Misturar partes iguais das soluções I e II. Esta solução deve ser preparada todas as semanas.

3. Solução aquosa saturada de ácido pícrico

Ácido pícrico [C ₆ H ₂ (OH)(NO ₂) ₃] (CI 10305)	2 g
Água destilada-deionizada	100 ml

- Adicionar o ácido pícrico a água. Agitar vigorosamente e deixar em repouso durante vários dias. Depois de 4 a 5 dias, alguns cristais do ácido picrico podem permanecer não dissolvidos. Usar o líquido sobrenadante límpido ou filtrar a solução. Essa solução diferenciadora tem conservação indefinida e não apresenta problemas de estocagem.

4. Solução de ácido-álcool

Ácido clorídrico (HCl) concentrado	30 ml
Álcool etílico absoluto q.s.p.	1.000 ml

5. Solução de álcool-etílico 70% amônia

Álcool etílico a 70%	50 ml
Amônia	0,5-1,0 ml

6. Solução fixadora acetato de sódio-ácido acético-formaldeído (SAF)

Acetato de sódio	1,5 g
Ácido acético glacial	2,0 ml
Formaldeído 37-40%	4,0 ml
Água destilada-deionizada	92,5 ml

- Misturar em um *beaker* os componentes. Estocar o fixador em frasco de plástico ou em frasco de vidro com tampa esmerilhada.

Preservação da Amostra

Misturar uma parte da amostra com três partes do fixador. O sedimento é usado para a preparação de esfregaços permanentes.

7. Albumina fixadora de Mayer⁹

- Colocar as claras de vários ovos frescos em um prato fundo.
- Bater as claras com um garfo ou com um batedor de ovos até que elas estejam brancas e viscosas.
- Deixar em repouso por uma hora e após retirar a espuma da superfície e transferir o líquido remanescente para uma proveta.
- Adicionar ao líquido igual volume de glicerina (v/v) e 1 g de salicilato de sódio ou timol ou 0,5 ml de tintura de mertiolato ou formaldeído 37-40%, para prevenir a proliferação de fungos, a cada 100 ml da mistura.
- Agitar vigorosamente a mistura e filtrar através de papel-filtro. A filtração é lenta, sendo necessário usar pequenas quantidades da mistura, com trocas diárias do filtro.

Coloração da Amostra**Preparação dos esfregaços**

Usar luvas durante todas as etapas da coloração

- Em uma lâmina, colocar uma gota da amostra fecal concentrada, preservada com SAF e uma gota de albumina fixadora de Mayer.
- Misturar as gotas e preparar um esfregaço estirado.

3. Deixar secar à temperatura ambiente (o esfregaço aparece opaco quando seco).

Coloração

1. Álcool etílico a 70%, 5 minutos.
2. Lavar com água destilada-deionizada (em cuba de Coplin), 2 minutos.
3. Corante de Kinyoun, 5 minutos. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
4. Lavar com água corrente, 1 minuto.
5. Solução ácido-álcool, 4 minutos*.
6. Lavar com água corrente, 1 minuto.
7. Solução corante de trabalho de hematoxilina férrica, 8 minutos. Cubas de Coplin deverão ser usadas nessa fase do processo de coloração.
8. Lavar com água destilada, 1 minuto.
9. Solução de trabalho de ácido pícrico, 3 a 4 minutos.
10. Lavar com água corrente, 10 minutos.
11. Álcool etílico a 70% amônia, 3 minutos.
12. Álcool etílico a 95%, 5 minutos.
13. Álcool etílico absoluto, 5 minutos.
14. Xilol ou tolueno (1), 5 minutos.
15. Xilol ou tolueno (2), 5 minutos.
16. Fazer a montagem com resina sintética

*A etapa 5 pode ser realizada como segue.

5. Solução de ácido-álcool, 2 minutos.
6. Lavar com água corrente, 1 minuto.
7. Solução de ácido-álcool, 2 minutos.
8. Lavar com água corrente, 1 minuto.
9. Continuar a seqüência da coloração na etapa 7.

Características da Coloração

Os trofozoitos e cistos de protozoários coram-se de azul-cinza ao preto, como também o material de fundo. As estruturas nucleares, os corpos de inclusão e o citoplasma adjacente apresentam-se em preto. Os oocistos de *C. parvum* e *I. belli* apresentam coloração do rosa ao vermelho ao púrpura intenso. Os oocistos da *Cycl. cayetanensis* aparecem arredondados de coloração rosa ao vermelho púrpura sobre um fundo cinza da preparação.

Controle de Qualidade

1. Incluir junto aos procedimentos de coloração uma lâmina controle com *C. parvum*, preparada com amostra fecal preservada em solução salina de formaldeído a 10%.
2. Quando os oocistos do *Cryptosporidium* apresentarem uma boa coloração (rosa-vermelho ao púrpura com o fundo da preparação em azul uniforme), o organismo *C. cayetanensis*, também tomarão o corante.

3. Conferir a aderência macroscópica dos espécimens à lâmina.
4. A coloração do rosa ao vermelho depende da penetração do corante, da espessura do esfregaço e da idade do espécime.
5. A solução salina de formaldeído a 10% apresenta a vantagem de fixar os oocistos e destruir o seu poder patogênico e inativar outros agentes infecciosos. Entretanto são contraditórias as afirmações de que os organismos perderiam a capacidade de tomar o corante (fucsina-fenicada) depois de um longo período de armazenamento em solução de formaldeído a 10%.
6. Testar diariamente a solução de trabalho da hematoxilina- férrica, pela adição de uma gota do corante à água corrente. Se não houver desenvolvimento de cor azul, preparar uma nova solução de trabalho.
7. O micrômetro ocular e o microscópio devem ser calibrados a cada 12 meses. Colocar as objetivas e as oculares originais no microscópico durante a calibração. Realizar a morfometria com micrômetro ocular.
8. Os resultados do controle de qualidade devem ser registrados. Quando necessários, seguir o plano de ação para resultados “fora de controle”.

Pontos-Chave – *Cyclospora cayetanensis*

1. Os oocistos *Cycl. cayetanensis* são grandes (8 a 10 μm), maiores do que os organismos normais de *C. parvum* (4 a 5 μm). Medir os oocistos para confirmar o tamanho. A morfometria com o micrômetro ocular é indispensável para a identificação das espécies.
2. As amostras fecais devem ser previamente concentradas; é recomendado centrifugar os espécimes por 10 minutos a 500 x g.
3. Pelo exame direto a fresco os oocistos aparecem como esferas não refráteis e autofluorescem em verde forte (filtro de excitação de 450 a 490 DM) ou em azul intenso (filtro de excitação de 365 DM) quando submetidos à ação da luz ultravioleta (UV).
4. Pelos métodos derivados de Ziehl-Neelsen, os oocistos coram-se do rosa ao vermelho, ao púrpura intenso sobre um fundo azul de intensidade de cor variável. Entretanto os oocistos não apresentam morfologia interna bem definida, com intensidade de cor variável. A parede dos oocistos apresenta uma típica aparência rugosa ou ondulada e colapso ou distorção em um ou em vários lados
5. Pela coloração safranina modificada, os oocistos aparecem arredondados com 8 a 10 μm , uniformemente corados em brilhante vermelho-alaranjado sobre um fundo azul (azul de metileno) ou verde (verde de malaquita). Os oocistos apresentam uma autofluorescência discreta ou moderada.
6. Os oocistos não se coram pelo tricrômio, mas aparecem como esferas torcidas, claras, pálidas e arredondadas.
7. Os oocistos não se coram pela hematoxilina férrica, Grocott-Gomori, Prata metamina, Iodo ou Ácido Periódico de Schiff (PAS).
8. Os oocistos da *Cyclospora* são duas vezes maiores em tamanho do que os estágios de diagnóstico do *C. parvum* (arredondados, esféricos ou ovais, com 4 a 5 μm . de diâmetro) e um terço menores do que a *I. belli* (elipsóides, 20 a 30 x 10 a 19 μm). A morfometria com o micrômetro ocular é indispensável para a identificação das espécies. As semelhança

morfológicas dos oocistos de *Cycl. cayetanensis* e *C. parvum* podem apresentar problemas no diagnóstico

9. Tamanho maior, variabilidade na coloração pelos derivados de Ziehl-Neelsen e autofluorescência exibida pela *Cyclospora* levam a uma diferenciação rápida dos oocistos do *Cryptosporidium*, das leveduras e dos artefatos comumente encontrados nas fezes.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Patrícia Lessa Flores da Cunha (Faculdade de Letras, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, RS) pela revisão ortográfica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ash, L.R. & Orihel, T.C. *Atlas of human parasitology*. American Society of Clinical Pathologists, Chicago, 1997.
2. Ashford, R.W. Occurrence of a undescribed coccidian in man in Papu New Guinea. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 73:479-500, 1979.
3. Baxby, D., Blundell, N. & Hart, C. The development and performance of a simple sensitive method for the detection of *Cryptosporidium* oocysts in feces. *J. Hyg.* 93:317-323, 1994
4. Berlin, O.G. *et al.* Autofluorescence and detection of *Cyclospora* oocysts. *Emerg. Inf. Dis.* 4:127-128, 1998
5. Collins, R. Protozoan parasites of the intestinal tract: A review of coccidia and microsporidia. *JAOA* 97:593-598.
6. Clarke, S.C. Laboratory diagnosis and autofluorescence of *Cyclospora*. *Br. J. Biomed. Sci.* 52:231, 1996.
7. Clarke, S.C. & McTibtyre, M. Incidental laboratory diagnosis of *Cyclospora cayetanensis*. *Br. J. Biomed. Sci.* 53:243, 1996.
8. De Carli, G.A. & Saraiva, P.J. Diagnóstico de laboratório da criptosporidiose humana. *Rev. Bras. Anál. Clín.* 23:26-30, 1991.
9. De Carli, G. A. *Diagnóstico Laboratorial das Parasitoses Humanas.. Métodos e Técnicas*. MEDSI, Rio de Janeiro, 1994.
10. De Carli, G.A. Identificação de coccídios intestinais: modificações ao método de Ziehl-Neelsen. *RBAC* 27:83-87, 1995.

11. De Carli, G.A., P.J. Saraiva & R.M.S. Issler. 1997. Infecções parasitárias e o hospedeiro imunocomprometido: diagnóstico laboratorial das enteroparasitoses. *RBAC* 29:24-28, 1997
12. Eberhard, M.L. *et al.* Laboratory diagnosis of *Cyclospora* infections. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 212:792-797, 1997.
13. Eimer, T. Ueber die ei-und kugelförmigen sogenannten Psorospermien der Wirbelthiere, p.1-58. Würzburg: A. Stuber's Verlagshandlung, 1870.
14. Garcia, L.S., Brewer, T.C & Bruckner, D.A.. A comparison of the formalin-ether concentration and trichrome-stained smear methods for the recovery and identification of intestinal protozoa. *Am. J. Med. Tech.* 45: 932-935, 1979.
15. Garcia, L.S., Bruckner, D.A., Brewer, T.C. & Shimizu R.Y. Techniques for the recovery and identification of *Cryptosporidium* stool specimen. *J. Clin. Microbiol.* 18:185-190, 1983.
16. Garcia, L.S. & R.Y. Shimizu. Diagnostic parasitology: An overview of topics. *Lab. Med.* 24:13-18, 1993.
17. Garcia, L.S., Bullock-Iacullo, S., Palmer, J & Shimizu, R.Y. Diagnosis of parasitic infections: collections, processing and examination of specimens. p 1145-1158. In P.R Murray (ed.), *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed, ASM Press, Washington, D.C., 1995.
18. Garcia, L.S. & Bruckner, D.A. *Diagnostic Medical Parasitology*, 3rd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1997.
19. Hafiz, D. *et al.* Use of microwave for acid and alcohol fast staining. *J. Clin. Pathol.* 38:1073-1076, 1985.
20. Murray P.R. *et al.* *Manual of Clinical Microbiology*. 6th ed. Washington, DC. American Society for Microbiology, 1995
21. Narango, J. *et al.* *Cryptosporidium muris*-like objects from fecal samples of Peruvians. Abstract 342. In: Proceedings of the 38th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, Honolulu. Allen Press, Lawrence, 1989.
22. Ortega, Y.R. *et al.* *Cyclospora cayetanensis*: a new protozoan pathogen of humans. Abstract 289. In: Proceedings of the 41st annual meeting of the American Society for Tropical Medicine and Hygiene, 1992.
23. Ortega, Y.R. *et al.* *Cyclospora* species – a new protozoan pathogen of humans. *N. Engl. J. Med.* 328:1308-1312, 1993.

24. Ortega, Y.R., Gilman, R.H. & Sterling, C.R. A new coccidian parasite (Apicomplexa:Eimeridae) from humans. *J. Parasitol.* 80:625-629, 1994.
25. Ortega, Y.R., Sterling, C.R & Gilman, R.H. *Cyclospora cayetanensis*. *Adv. Parasitol.*, 40:399-418, 1998
26. Palmer, J. 1991. Modified iron hematoxylin/Kinyoun stain. *Clin. Microbiol. News*, 13:39-40 (Letter).
27. Pieniazek N.J. *et al.* PCR confirmation of infection with *Cyclospora cayetanensis*. *Emerg. Infect. Dis.* 2:342-343, 1996.
28. Schneider, A. Sur les psorospermies oviformes ou coccidies, espèces nouvelles ou oeu connues. *Arch. Zool. Exp. Gen.* 9:387-404, 1881.
29. Shimizu R.Y. Special stains for *Cryptosporidium* spp. p 7.10.8.2-7.10.8.2 In: H.D. Isenberg (ed). *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, vol 2. American Society for Microbiology, Washington, DC., 1992.
30. Soave, R. *Cyclospora*. *Inf. Dis. Clin. North Amer.* 12:1-2, 1998.
31. Terra, L., Pellicano, S. & Milano, M. Diagnosi di laboratori delle microparassitosi intestinali in pazienti affetti da AIDS: stato dell'arte. *Minerva Med.* 89:23-27, 1998.
32. Visvesvara, G.S. *et al.* Uniform staining of *Cyclospora* oocysts in fecal smears by a modified safranin technique with microwave heating. *J. Clin. Microbiol.* 35:730-733, 1997.

Efeito interferente do ácido ascórbico nas determinações de parâmetros bioquímicos séricos

Ascorbic acid interference on the measurement of serum biochemical
parameters

Edson L. da Silva¹, Emília R. Scharf², Flávia Martinello², Daniel M. de Luca³,
Gabriela R. Amorin³, Leandro Corradi³ & Toni R. Martins³

Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde,
Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

Apoio Financeiro: FUNPESQUISA - UFSC.

¹Prof. Adjunto de Bioquímica Clínica; ²Alunas de Iniciação Científica (PIBIC/CNPq)
do Curso de Farmácia; ³Alunos do Curso de Farmácia, Habilitação Análises Clínicas.

Correspondência para:

Edson Luiz da Silva

Departamento de Análises Clínicas, CCS - Universidade Federal de Santa Catarina,

Campus Universitário, Trindade, Florianópolis-SC. CEP 88.040-970

E-mail: edson@ccs.ufsc.br

RESUMO: O ácido ascórbico, quando presente em amostras biológicas, pode interferir nos ensaios laboratoriais que utilizam reações de óxido-redução. O objetivo desse estudo foi estabelecer o grau de interferência do ácido ascórbico nas determinações bioquímicas séricas em relação à dose de vitamina C ingerida por indivíduos saudáveis e ao tempo de coleta das amostras. Voluntários saudáveis (n=13) consumiram doses de 0,25 a 4,0 g/dia de vitamina C e as determinações bioquímicas foram realizadas em amostras obtidas 4, 12 e 24 h após a ingestão. Os níveis de ácido ascórbico sérico aumentaram significativamente 4 e 12 h após a ingestão das várias doses de vitamina C. Dentre os parâmetros analisados, observou-se uma diminuição significativa nos valores séricos de ácido úrico e bilirrubina, inversamente proporcional aos níveis de ácido ascórbico presentes nas amostras ($r = -0,57$ para urato e $-0,33$ para bilirrubina, $p < 0,05$). Após 24 h ocorreu ainda 18% de interferência para o ácido úrico com a dose de 4 g de vitamina C ($p < 0,05$). Em contrapartida, o ácido ascórbico não interferiu nas determinações de glicose, colesterol, triglicérides, uréia, fósforo e creatinina. Para evitar resultados falso-negativos de ácido úrico e bilirrubina sugerimos a suspensão da ingestão de vitamina C em até 48 h antes da coleta de sangue para as análises.

UNITERMOS - Ácido ascórbico, interferência, parâmetros séricos, reação de Trinder

SUMMARY - Ascorbic acid, when present in biological fluids, interferes in the laboratory assays with redox indicator systems. The goal of this work was to evaluate the level of ascorbic acid interference on the measurement of several chemical serum parameters in relation to the dose level of vitamin C ingested and the time period of sample collection. Healthy volunteers (n=13) consumed 0.25 to 4.0 g/d of vitamin C orally and the assays were performed in samples collected at 4, 12, and 24 h after ingestion. Serum ascorbic acid level increased significantly 4 and 12 h after vitamin C ingestion ($p<0,05$). Among the parameters studied, there was a decrease in the serum values of urate and bilirubin, inversely related to the level of serum ascorbic acid ($r = -0,57$ and $-0,33$, respectively, $p<0,05$). After 24 h still occurred 18% of interference for urate with 4 g vitamin C ($p<0,05$). In contrast, ascorbic acid did not inhibit the Trinder reactions for glucose, cholesterol, triglycerides, and for urea, phosphate, and creatinine. To prevent false-negative results for urate and bilirubin, we suggest that intake of vitamin C should be avoided at least 48 h before blood collection for analysis.

KEYWORDS - Ascorbic acid, interference, serum parameters, Trinder's reaction.

INTRODUÇÃO

O crescente consumo de altas doses de vitamina C (ácido ascórbico) tem se tornado um agravante para os analistas clínicos. O ácido ascórbico é facilmente absorvido e atinge níveis séricos relativamente elevados, sendo o excesso eliminado pela urina^{4,5}. Por ser um potente agente redutor, o ácido ascórbico é um conhecido interferente nas reações bioquímicas que envolvem sistemas indicadores de óxido-redução. Alguns parâmetros bioquímicos séricos, como glicose, colesterol, triglicérides e ácido úrico, podem ser determinados por oxidases específicas que produzem o peróxido de hidrogênio. Este por sua vez, participa da reação de oxidação de um cromógeno catalisada por uma segunda enzima peroxidase (reação de Trinder⁹). O ácido ascórbico interfere nessa sequência de reações, reduzindo o peróxido de hidrogênio ou competindo com o cromógeno, produzindo assim, resultados falsamente diminuídos^{1,3,6-8,10,12,13}. Além de inibir a reação de Trinder, o ácido ascórbico pode também interferir nas reações para a determinação de bilirrubina^{3,5}, creatinina^{1,3,5,6,10,11}, fósforo¹⁰, uréia⁶ e das enzimas aminotransferases⁵, lactato desidrogenase⁵ e fosfatase alcalina^{3,5}.

Apesar do efeito provocado pelo ácido ascórbico ser conhecido há muito tempo, bem como também as modificações introduzidas nas formulações dos reagentes para minimizar o efeito interferente, o fenômeno parece ainda existir. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação interferente do ácido ascórbico em função de duas variáveis: a) dose de vitamina C ingerida, considerando uma suplementação sem prescrição médica e, b) tempo de coleta da amostra após a ingestão da vitamina. Nossos resultados demonstraram que ocorreu interferência significativa na determinação de ácido úrico com doses relativamente pequenas de vitamina C (250 mg) quando a amostra foi coletada 4 e 12 h

após a ingestão. Com doses maiores de vitamina C o efeito inibitório foi observado, inclusive, 48 h após a ingestão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais. A vitamina C, comercializada na forma de comprimidos efervescentes, ou em gotas, Redoxon® (Roche), foi adquirida nas farmácias e drogarias. Os “kits” de reagentes foram gentilmente fornecidos pela Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte-MG. O ácido ascórbico e o ácido metafosfórico foram obtidos da Merck. Os demais reagentes utilizados, ácido sulfúrico, 2,4-dinitrofenil-hidrazina, tiouréia, sulfato de cobre e cloreto de sódio foram de marcas nacionais.

Protocolo experimental. Treze voluntários considerados saudáveis pela equipe médica do HU-UFSC, consumiram diariamente, por via oral, doses crescentes e sucessivas de 250, 500, 1000, 2000 e 4000 mg de vitamina C. Cada dose foi ingerida de forma única após a última refeição do dia, durante 7 dias consecutivos com intervalo de 3 dias entre cada dose. As amostras de sangue foram coletadas na manhã do 8º dia, 12-13 h após a ingestão da vitamina C e igual período de jejum. Após a coleta de sangue, os indivíduos ingeriram uma última dose de vitamina C e amostras subsequentes foram coletadas após 4 e 24 h. Durante a ingestão das doses inferiores a 2 g foi evitado o consumo de alimentos ricos em vitamina C. Os soros foram isolados por centrifugação e as determinações bioquímicas foram realizadas imediatamente. Os resultados foram comparados com 3 valores obtidos em diferentes semanas antes da suplementação com a vitamina C, após jejum de 4 e 12 h (níveis basais de cada indivíduo).

Determinações dos analitos bioquímicas. O soro foi obtido por centrifugação do sangue a 1500g por 15 min e analisado imediatamente. As determinações dos parâmetros bioquímicos foram realizadas segundo as instruções do fabricante

utilizando-se os seguintes métodos: Reação de Trinder para glicose (glicose oxidase), colesterol total (colesterol oxidase), triglicérides (lipase e glicerol oxidase) e ácido úrico (uricase). A uréia foi determinada pelo método da urease (colorimétrico), a creatinina pelo picrato alcalino com duas leituras (Jaffé), a bilirrubina por diazotização com o ácido sulfanílico e o fósforo por reação com o molibdênio (colorimétrico e UV). Ensaio adicionais foram realizados com as amostras de 12 h após repouso a 4°C por 6 h.

Determinação do Ácido Ascórbico Sérico. O ácido ascórbico presente nas amostras de soro obtidas antes e após a suplementação oral com a vitamina C foi determinado imediatamente após a coleta do sangue, utilizando-se o método espectrofotométrico da 2,4-dinitrofenil-hidrazina⁴.

Análise Estatística. As diferenças entre os valores obtidos antes e após a suplementação com a vitamina C foram verificadas pela Análise de Variância (ANOVA) para medidas repetidas e teste complementar de Tukey (considerando 3 valores basais) e teste *t* pareado de Student (considerando a média dos valores basais). Foi realizada também a Análise de Regressão Linear (Correlação de Pearson) entre os valores dos analitos bioquímicos e os níveis de ácido ascórbico séricos e entre estes e a dose de vitamina C ingerida. Foi considerado um nível de significância de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Concentração de ácido ascórbico sérico.

A Figura 1 mostra os níveis de ácido ascórbico no soro dos indivíduos, antes e após a ingestão das várias doses de vitamina C. A concentração de ácido ascórbico aumentou significativamente 4 h após a ingestão de apenas 250 mg de vitamina C em relação aos valores basais (0,125 vs 0,06 mmol/l, respectivamente, $p < 0,05$). Com a ingestão de doses maiores de vitamina C ocorreu um aumento crescente nos níveis de ácido ascórbico sérico ($r = 0,80$; $p < 0,01$), atingindo um máximo de $0,21 \pm 0,03$ mmol/l ($3,65 \pm 0,52$ mg/dl) com a dose de 4 g. A quantidade de ácido ascórbico presente no soro obtido 12 h após a ingestão de 1, 2 e 4 g de vitamina C foi significativamente maior do que os níveis basais ($p < 0,05$), correlacionando-se ainda, com a dose ingerida ($r = 0,78$; $p < 0,01$). Independente da dose de vitamina C consumida, os valores séricos retornaram aos níveis basais após 24 h. Apesar da ausência de significância, as amostras obtidas após a ingestão de 4 g da vitamina apresentaram níveis de ácido ascórbico 40% maiores do que os valores basais.

Interferência nas reações bioquímicas.

A Tabela I mostra os resultados das determinações dos parâmetros bioquímicos em amostras de soro obtidas 4 h após a ingestão das várias doses de vitamina C. Dentre os vários parâmetros analisados somente o ácido úrico e a bilirrubina sofreram interferência pelo ácido ascórbico. Os valores basais (0g de vitamina C) são a média de 3 determinações realizadas antes da suplementação vitamínica. A variação biológica intra-individual encontrada para o ácido úrico foi de 5,1 a 6,5% e para a bilirrubina foi de 5 a 18,4%. Os níveis séricos de ácido úrico

diminuíram progressivamente 4 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C ($r = -0,56$; $p < 0,05$; Figura 2). Ocorreu uma inibição de $21,3 \pm 8,5\%$ ($p < 0,01$; Tabela IV) inclusive com a menor dose de vitamina C analisada (0,25 g). Os valores de bilirrubina também diminuíram, porém a interferência foi da ordem de 25-30% ($p < 0,05$; Tabela IV) sem apresentar uma alta correlação com os níveis de ácido ascórbico sérico ($r = -0,33$; $p < 0,05$; Figura 3). Os níveis de triglicérides diminuíram em torno de 45% após a ingestão de 4 g de vitamina C (Tabela I), no entanto essa variação não foi estatisticamente significativa, provavelmente devido à grande variação dos resultados. Resultados estatísticos semelhantes foram obtidos pela análise de variância e teste complementar de Tukey utilizando-se os 3 valores basais.

Ocorreram interferências significativas nas determinações de ácido úrico com as amostras obtidas 12 h após a ingestão da vitamina C (Tabela II), porém em menor grau se comparadas com as amostras de 4 h. Níveis significativos de inibição (25-30%, $p < 0,001$; Tabela IV) foram observados somente após a ingestão de doses ≥ 1 g de vitamina C. Em relação aos valores de bilirrubina, o nível de interferência foi semelhante ao de 4 h, porém com uma correlação maior com o ácido ascórbico sérico ($r = -0,44$; $p < 0,05$). A Tabela III mostra os resultados obtidos 24 h após a suplementação vitamínica. O grau de interferência diminuiu sensivelmente, no entanto ainda foi possível observar uma inibição de 18% na reação de ácido úrico com as amostras coletadas após a ingestão de 4 g de vitamina C.

Considerando que o ácido ascórbico em solução possui uma meia-vida de aproximadamente 3 h⁴ e que o efeito inibitório deve diminuir à medida que o ácido ascórbico sofre auto-oxidação, ensaios adicionais para o ácido úrico foram realizados com as amostras obtidas após a ingestão de 2 e 4 g de vitamina C após repouso das

mesmas a 4°C por 6 h. Os valores para o ácido úrico assim obtidos foram semelhantes aos anteriormente determinados, 1-2 h após a coleta. Resultados preliminares de ensaios *in vitro* têm revelado que o efeito inibitório do ácido ascórbico, dependendo da quantidade presente na amostra, pode persistir por um tempo mais longo do que normalmente se imagina. Por exemplo, a adição de 0,17 mmol/l (3 mg/dl, concentração final) de ácido ascórbico em um “pool” de soro humano provocou uma inibição nas reações de ácido úrico de aproximadamente 84, 68, 60 e 42% após 2, 6, 24 e 48 h, respectivamente.

DISCUSSÃO

A interferência do ácido ascórbico nos ensaios laboratoriais é conhecida há longo tempo e para minimizar o problema algumas modificações nas formulações dos reagentes foram introduzidas pelos fabricantes de “kits”. No entanto, com o crescente consumo de elevadas doses de vitamina C pela população, como forma de auto-medicação para prevenir resfriados, doenças cardiovasculares e cânceres, torna-se importante analisar o efeito interferente do ácido ascórbico considerando-se o seu metabolismo. Assim, o principal objetivo desse estudo foi demonstrar que doses de vitamina C, normalmente consumidas de forma crônica pelas pessoas saudáveis, podem interferir de forma significativa em alguns ensaios laboratoriais, dependendo dose de vitamina C consumida e do tempo em que a amostra de sangue foi coletada após a ingestão da vitamina.

Nossos resultados demonstraram que os níveis de ácido ascórbico sérico aumentaram 2 vezes (0,06 vs 0,12 mmol/l; $p < 0,05$), 4 h após a ingestão de uma dose relativamente pequena de vitamina C (250 mg). Esse aumento de ácido ascórbico foi suficiente para provocar uma inibição de 21% ($p < 0,05$) na reação para a determinação de ácido úrico (uricase/peroxidase). Naturalmente, a concentração do ácido ascórbico sérico aumentou significativamente com a ingestão de doses maiores de vitamina C ($r = 0,80$), causando uma interferência máxima de 55% após a ingestão de 2 e 4 g de vitamina C (Tabela IV). O tempo necessário para a eliminação plasmática do excesso de ácido ascórbico, após a interrupção da suplementação vitamínica, foi dependente da dose ingerida (Figura 1). Assim, as doses $\leq 0,5$ g foram eliminadas nas primeiras 12 h após a ingestão, enquanto que as doses de 1,0 e 2,0 g necessitaram de 24 h para completa eliminação do excesso e pelo menos 48 h para a dose de 4 g de vitamina C.

Conseqüentemente, o grau de inibição observado nos ensaios de ácido úrico foi progressivamente menor nas amostras coletadas 4, 12 e 24 h após a ingestão da vitamina C. Vale a pena ser destacado o fato de que uma dose moderada de vitamina C (1,0 g) provocou interferência significativa em amostras de sangue coletadas 12 h após a ingestão e no caso de 4 g, inclusive, 24 h após. As interferências observadas nas reações para a determinação da bilirrubina total (diazotização) foram significativas nas amostras coletadas 4 e 12 h após a ingestão de doses $\geq 0,5$ g de vitamina C, no entanto, o grau de inibição não apresentou uma nítida correlação com os níveis séricos de ácido ascórbico.

É interessante notar que, mesmo com a maior dose de vitamina C estudada (4 g), não ocorreram interferências significativas nas reações para a determinação de glicose, colesterol, creatinina, fósforo e uréia (Tabelas I e II). Os níveis de triglicérides diminuíram em média 45%, 4 h após a ingestão de 4 g de vitamina C, porém essa variação não foi estatisticamente significativa a nível de 5%. Utilizando concentrações mais elevadas de ácido ascórbico em experimentos *in vitro*, sem considerar portanto a variação biológica dos parâmetros bioquímicos, outros autores têm demonstrado uma inibição significativa para a maioria dos ensaios que utilizam reações de óxido-redução^{3,6-8,13}. Certamente, concentrações elevadas de ácido ascórbico podem ser encontradas no soro de pacientes com cânceres que estão recebendo tratamentos com mega doses de vitamina C^{1,2}.

Tendo em vista a pequena meia-vida do ácido ascórbico em solução (aprox 3 h)⁴, alguns fabricantes de reagentes sugerem que o ensaio seja repetido após 1-2 horas, quando a amostra contém o ácido. Nossos resultados demonstraram que, dependendo da quantidade de ácido ascórbico presente na amostra, o período de 6 h não foi

suficiente para ocorrer diminuição da interferência. Portanto, essa parece ser uma medida inviável para a rotina laboratorial como forma de contornar o problema da interferência. Naturalmente, todas as conclusões oriundas desse estudo são relativas aos reagentes da Labtest Diagnóstica. Estamos realizando experimentos adicionais com “kits” de reagentes de outros fabricantes, mas enquanto não surge no mercado uma formulação mais resistente para o ácido úrico e bilirrubina, sugerimos que o consumo de vitamina C seja interrompido 12, 24 e 48 h antes da coleta do sangue para a realização dos exames quando as doses ingeridas forem $\leq 0,5$, 1-2 e 4g, respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Laboratório Labtest Diagnóstica, pelo fornecimento dos “kits” de reagentes.

FUMPESQUISA - UFSC.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Badrick, T. & Campbell, B.** Effects of intravenous infusion of ascorbate on clinical chemistry tests. *Clin. Chem.* 38(10): 2160, 1992.
2. **Cameron, E.** Protocol for use of vitamin C in treatment of cancer. *Med. Hypotheses*, 36:190-194, 1991.
3. **Freemantle, J., Freemantle, M.J. & Badrick, T.** Ascorbate interferences in common clinical assays performed on three analyzers. *Clin. Chem.* 40(6): 950-951, 1994.
4. **McCormick, D.B. & Greene, H.L.** Vitamins (Ascorbic acid). In: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Burtis, C.A. and Ashwood, E.R., 2nd ed. W.B. Saunders Co. Philadelphia, PA, USA, 1994, p. 1311-1316.
5. **Miller, S.M.** Vitamins (Water-soluble vitamins). In: *Clinical Chemistry. Principles, Procedures, Correlations*. Bishop, M.L., Duben-Engelkirk, J.L. and Fody, E.P. 3rd ed. Lippincott Com. Philadelphia, PA, USA, 1996, p. 603-607.
6. **Pedrazzi, A.H.P., Rodrigues, E.R. & Zanardo-Filho, A.** Ação redutora da vitamina C em bioquímica clínica. *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 30(1): 5-6, 1998.
7. **Pesce, M.A. & Bodourian, S.H.** Interference with the enzymic measurement of cholesterol in serum by use of five reagent kits. *Clin. Chem.*, 23(4): 757-760, 1977.
8. **Rodrigues, E.R., Pedrazzi, A.H.P., Franco, J.J. & Zanardo-Filho, A.** Ação interferente do ácido ascórbico no doseamento da glicose sérica e urinária e do ácido úrico sérico, "in vitro". *Rev. Bras. Anal. Clin.*, 29(4): 220-222, 1997.
9. **Trinder, P.** Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor. *Ann. Clin. Biochem.*, 6: 24-27, 1969.

10. **Siest, G., Appel, W., Blijenberg, G.B., Capolaghi, B., Galteau, M.M., Heusghem, C., Hjelm, M., Lauer, K.L., Le Perron, B., Loppinet, V., Love, C., Royer, R.J., Tognoni, C. & Wilding, P.** Drug interference in clinical chemistry: studies on ascorbic acid. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 16(2): 103-110, 1978.
11. **Weber, J.A. & van Zanten, A.P.** Interferences in current methods for measurements of creatinine. *Clin. Chem.*, 37(5): 695-700, 1991.
12. **White-Stevens, R.H. & Stover, L.R.** Interference by ascorbic acid in test systems involving peroxidase. II. Redox-coupled indicator systems. *Clin. Chem.* 28(4): 589-595, 1982.
13. **Zoppi, F. & Fenili, D.** Drug interferences in reactions for detecting hydrogen peroxide by means of peroxidase. *Clin. Chem.*, 26: 1229-1230, 1980.

TABELA I
Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dl) determinados antes e 4 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C (n =10)

Vitamina C (g/dia)	0	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Ác. Ascórbico (mmol/l)	0,06±0,02	0,12±0,03*	0,13±0,03**	0,14±0,02**	0,18±0,02***	0,21±0,03**
Ácido Úrico	4,7±1,8	3,7±1,5**	3,2±1,2**	2,8±0,6***	2,1±1,0***	2,1±0,5***
Bilirrubina	0,66±0,17	0,69±0,22	0,44±0,17**	0,49±0,11*	0,48±0,24*	0,47±0,1*
Colesterol Total	153±15,1	171,8±34,1	161,7±20,6	166,2±34,5	163,4±34,8	171,9±25,5
Creatinina	1,00±0,13	1,08±0,17	1,18±0,10	0,93±0,09	1,01±0,12	1,13±0,10
Fósforo UV	3,9±0,31	4,2±0,56	4,2±0,79	5,0±0,32	4,3±0,70	3,9±1,11
Fósforo Color.	3,5±0,25	4,0±0,23	3,6±0,27	3,6±0,80	3,2±0,40	2,7±0,19
Glicose	89,0±6,3	84,5±11,8	91,7±13,4	86,5±10,1	82,2±5,5	93,7±6,1
Triglicérides	98,5±34,5	99,8±39,1	85,5±6,6	102,3±43,3	59,6±33,8	54,3±28,2
Uréia	31,0±3,5	30,8±4,5	33,5±3,8	29,5±3,8	28,6±4,3	33,7±5,4

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, comparado ao respectivo controle (0 Vit. C). Teste *t* Pareado de Student.

TABELA II

Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dl) determinados antes e 12 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C (n = 13)

Vitamina C (g/dia)	0	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
Ác. Ascórbico (mmol/l)	0,07±0,01	0,09±0,04	0,10±0,04	0,11±0,02*	0,11±0,01**	0,18±0,02***
Ácido Úrico	4,6±1,42	4,2±1,35	4,18±1,65	3,48±1,4***	3,42±1,41***	3,17±1,05***
Bilirrubina	0,75±0,18	0,72±0,13	0,57±0,26**	0,56±0,17**	0,51±0,12**	0,48±0,14***
Colesterol Total	159±18,3	166,8±33,2	166,8±24,2	169,8±22,7	160,6±33,9	157,2±21,3
Creatinina	0,94±0,13	1,10±0,15	1,05±0,19	1,10±0,15	1,03±0,10	0,86±0,17
Fósforo UV	4,01±0,44	3,63±0,38	3,90±0,19	4,66±0,81	4,47±0,57	4,17±0,69
Fósforo Color.	3,73±0,31	...	3,52±0,39	3,38±0,61	3,87±0,61	3,67±0,29
Glicose	85,9±6,6	92,4±12,5	87,5±16,2	78,5±13,8	82,2±8,2	89,5±10,9
Triglicérides	72,1±26,0	79,2±38,0	86,4±28,6	73,2±27,2	60,2±22,0	48,3±12,6
Uréia	28,3±4,5	31,9±4,9	28,9±5,5	27,3±4,8	29,2±5,3	28,5±5,5

*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001, comparado ao respectivo controle (0 Vit. C). Teste *t* Pareado de Student.

TABELA III

Parâmetros bioquímicos séricos (mg/dl) determinados antes e 24 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C (n = 6)

Vitamina C (g/dia)	0	0,50	1,0	2,0	4,0
Ác. Ascórb. (mmol/l)	0,07±0,01	0,08±0,01	0,06±0,01	0,09±0,01	0,10±0,02
Ácido Úrico	4,03±1,54	...	3,75±1,34	3,83±1,63	3,30±1,42**
Bilirrubina	0,68±0,20	...	0,74±0,18	0,85±0,14	0,79±0,64

**p<0,01, comparado ao respectivo controle (0 Vit. C). Teste *t* Pareado de Student.

TABELA IV

Interferência do ácido ascórbico nas reações de ácido úrico e bilirrubina 4, 12 e 24 horas após a ingestão de doses crescentes de vitamina C (% de inibição ± DP)

Vitamina C (g/dia)	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0
4 horas					
Ácido Úrico	21,3±8,5 ^b	31,9±12,8 ^b	40,4±8,0 ^c	55,3±27,6 ^c	54,2±14,7 ^c
Bilirrubina	0	33,3±13,3 ^b	25,7±5,9 ^a	27,3±13,6 ^a	28,8±7,2 ^a
12 horas					
Ácido Úrico	8,7±2,6	9,1±2,7	24,3±9,7 ^c	25,6±10,2 ^c	31,1±10,9 ^c
Bilirrubina	4,0±0,8	24,0±12,0 ^b	25,3±6,3 ^b	32,0±7,4 ^b	36,0±9,0 ^c
24 horas					
Ácido Úrico	6,9±2,7	5,0±2,0	18,1±7,2 ^b
Bilirrubina	...	0	0	0	0

^ap<0,05; ^bp<0,01; ^cp<0,001, comparado ao controle (Teste *t* Pareado de Student).

Figura 1

Níveis séricos de ácido ascórbico em amostras coletadas antes e 4, 12 e 24 h após a ingestão de doses crescentes de vitamina C. *p<0,05; **p<0,01; *p<0,001 comparado ao respectivo controle (0 g vit. C), teste *t* pareado de Student.**

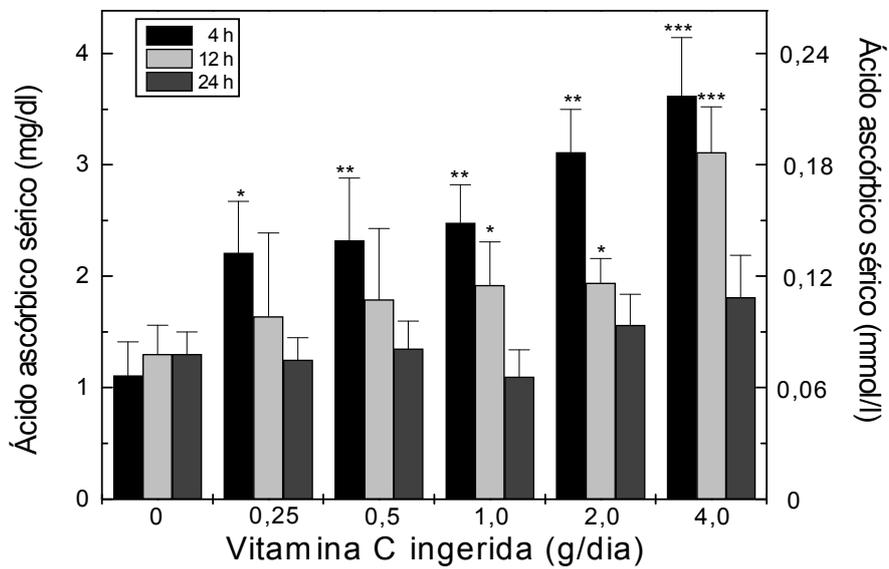


Figura 2

**Correlação de Pearson entre os níveis séricos de ácido úrico e de ácido ascórbico,
4 h após a ingestão de 0,25 a 4,0 g de vitamina C.**

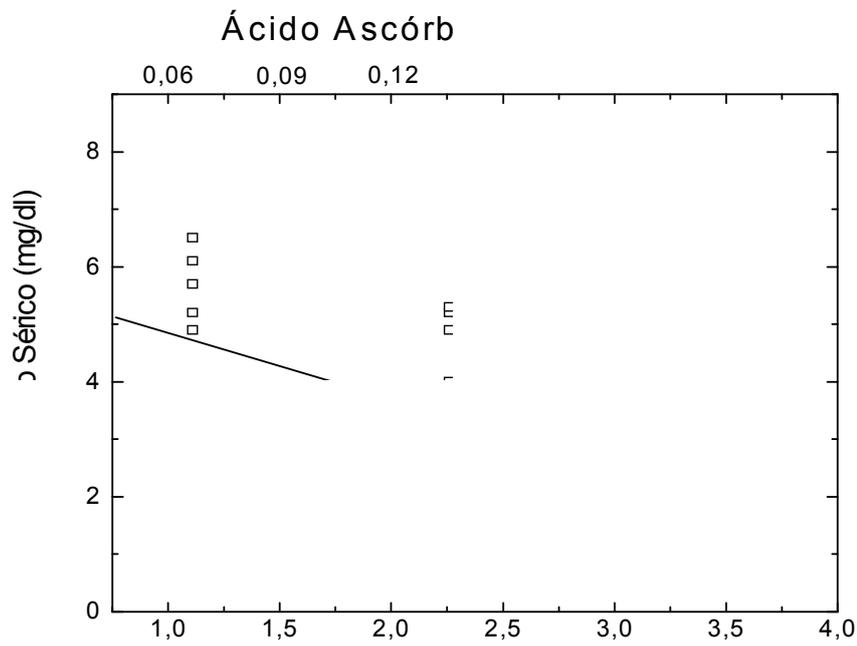
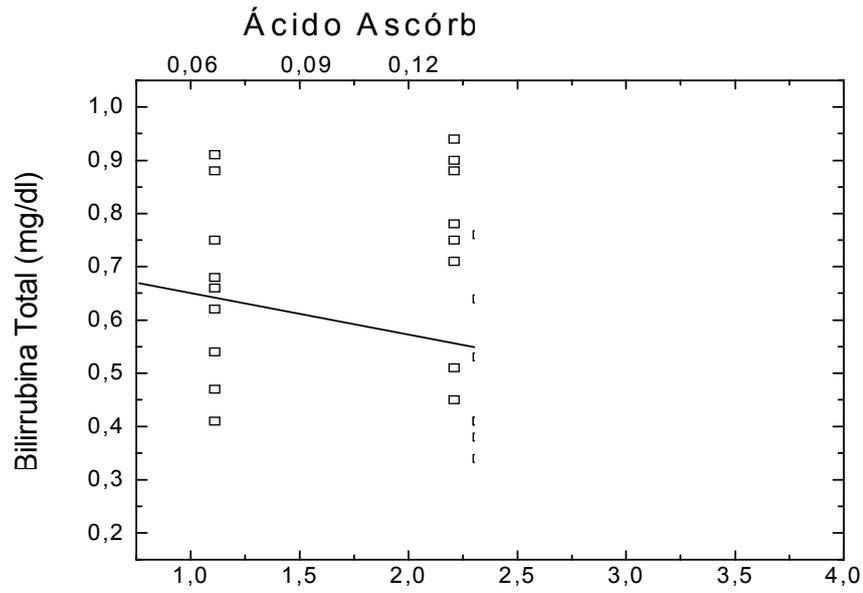


Figura 3

Correlação de Pearson entre os níveis séricos de bilirrubina total e de ácido ascórbico, 4 h após a ingestão de 0,25 a 4,0 g de vitamina C.



Fosfatase alcalina óssea em crianças e adolescentes com osteopenia colestática: estudo de dois métodos de determinação da atividade da enzima *

Bone alkaline phosphatase in children and adolescents with cholestatic osteopenia: study of two methods for determination of enzymatic activity

Sandra Vieira ¹, Beatriz Amaral ², Jarbas R de Oliveira ³, Themis R da Silveira ⁴

* Serviço de Pediatria, Unidade de Gastroenterologia Pediátrica e Nutrição, Serviço de Patologia Clínica e Laboratório de Pesquisas Biomédicas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Ramiro Barcelos 2350, sala 1032, CEP 90035-003, Porto Alegre, RS.

Clínica RADIMAGEM. Porto Alegre, RS.

1. Mestre em Pediatria pelo Curso de Pós-Graduação em Medicina: Pediatria, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.
2. Mestre em Bioquímica pelo Curso de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.
3. Doutor em Bioquímica pela Universidade de Barcelona.
4. Professora Adjunto do Departamento de Pediatria da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS.

Endereço para Correspondência:

Dra. Sandra M.G. Vieira
Rua Vicente da Fontoura, 2412 apto. 104
Porto Alegre - RS

RESUMO

Osteopenia pode acometer tanto adultos quanto crianças e adolescentes com colestase crônica. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade da fosfatase alcalina óssea em um grupo de 20 pacientes pediátricos caucasóides, 12 masculinos, idade entre 3 e 18 anos (mediana = 6,0 anos). Todos os pacientes apresentavam colestase crônica, sendo cirrose criptogênica e atresia de vias biliares extra-hepática, os diagnósticos mais prevalentes (30% e 25% respectivamente). Todos os pacientes tinham densidade óssea mineral abaixo do escore Z para idade e sexo. Dezesesseis indivíduos normais, caucasóides, 11 do sexo masculino, idade entre 1,8 e 20 anos (mediana = 4,5 anos) participaram como controles. Dois métodos de determinação da atividade da fosfatase alcalina foram estudados: o método da precipitação por lectina de germe de trigo e o método da inativação pelo calor. Determinou-se o coeficiente de variação de cada método, a capacidade de recuperação da fosfatase alcalina óssea em soros de pacientes com Doença de Paget em atividade e o coeficiente de correlação entre os métodos. O método da inativação pelo calor apresentou melhor coeficiente de variação do que o método da precipitação por lectina (CV = 4,5% X CV= 14,9 %, respectivamente) e recuperou maior porcentagem da fosfatase alcalina óssea presente nas amostras de soros de pacientes com Doença de Paget (95% X 42,6 %, respectivamente). Os métodos apresentaram boa correlação (74%). Hiperfosfatemia alcalina óssea foi observada em 97% dos pacientes, sendo estatisticamente significativa a diferença entre pacientes e controles ($p < 0,0001$). Conclusões: a) atividade elevada da fosfatase alcalina óssea parece ser comum a pacientes com osteopenia colestática. b) o método da inativação pelo calor para determinação da

atividade da fosfatase alcalina óssea é preciso, exato, de fácil execução e superior ao método da precipitação por lectina de germe de trigo.

Unitermos - osteopenia colestática, fosfatase alcalina óssea, método da inativação pelo calor, método da precipitação por lectina de germe de trigo.

SUMMARY

Osteopenia is a common occurrence not only in adults but also in children and adolescents with chronic cholestasis. The goal of this study was to assess the bone alkaline phosphatase activity in a group of 20 Caucasians patients, 12 males, 3 to 18 years (median = 6,0 years). All patients had chronic cholestasis and the most prevalent diagnostic were cryptogenic cirrosis and extra hepatic biliary atresia (30% and 25%, respectively). All had bone mineral density bellow of z score for age and sex. Sixteen normal subjects, Caucasians, 11 males, 1,8 to 20 years (median: 4,5 years) were controls. Two methods for quantification of the bone alkaline phosphatase activity were tested: the method of heat inativation and the method by lectin precipitation. Were studied the reproducibility, the recuperation of each method and the correlation between them. For the last one, we used serum of patients with Paget Disease. The method of heat inativation had the better coeficient of variation (4,5%) than the lectin precipitation (14,9%) and was able to recuperate 95% of the bone alkaline phosphatase activity presented in serum of patients with Paget Disease. The lectin precipitation recuperated 42,6% of this enzymatic activity in these serum. The methods had good correlation (74%). High bone alkaline phosphatase activity was observed in 97% of patients with significant statistical difference between patients and controls ($p < 0,0001$). The conclusions are: a) high alkaline phosphatase activity ocured in the majority of patients (97%). b) the heat inactivation assay for quantification of bone alkaline phosphatase activity is a simple, precise and accurate method.

Key words - cholestatic osteopenia, bone alkaline phosphatase activity, method of heat inativation, method by lectin precipitation.

INTRODUÇÃO

Osteodistrofia hepática, doença óssea metabólica associada à hepatopatia crônica, pode complicar todas as formas de colestase crônica. A etiologia é desconhecida e o diagnóstico baseia-se em avaliação radiológica, determinação de marcadores bioquímicos de formação e reabsorção óssea e biópsia óssea. Só a biópsia é capaz de identificar o processo metabólico responsável pela osteopenia. Entretanto é um método invasivo e que exige o uso prévio de tetraciclinas, o que dificulta a sua utilização em pediatria. A combinação de métodos radiológico e bioquímico, parecem ser uma alternativa para o diagnóstico da osteopenia colestatia na faixa etária pediátrica. Os métodos radiológicos mais modernos, especialmente a densitometria óssea de dupla emissão, com fonte de raios x (DEXA), fornecem um diagnóstico acurado e preciso de osteopenia. A determinação de marcadores bioquímicos associados ao metabolismo ósseo podem sugerir com boa precisão o processo metabólico responsável pela osteopenia. A fosfatase alcalina é um bom marcador de formação óssea. Os métodos habituais de determinação são de fácil execução, baixo custo e boa precisão. Todavia, a atividade total da enzima reflete a soma das atividades das fosfatases alcalinas de diferentes tecidos: osso, fígado, rins, placenta ¹. Os valores de referência relacionam-se fortemente às faixas etárias estudadas e a situação individual de cada paciente. A atividade sérica desta enzima no recém-nascido é superior aos valores de normalidade do adulto e aumenta rapidamente atingindo 2,5 a 3,0 vezes esse valor no primeiro ano de vida. No final do segundo ano, estes valores caem para 1,5 a 2,0 vezes os níveis do adulto e a partir daí, mantém-se aproximadamente constantes durante toda a infância e início da adolescência quando então, declinam ². Estas alterações são diretamente proporcionais ao crescimento ósseo, de modo que acelerações ou retardos nas taxas de crescimento são acompanhadas por elevação ou diminuição da fosfataseemia ³. Doenças hepáticas colestatias também causam elevação da fosfatase alcalina total, às custas da fração hepática da enzima. Observam-se

também elevação da fosfatase em situação como transplante renal, doenças neoplásicas metastáticas e fisiologicamente na gestação. Assim, falta especificidade à atividade total da enzima.

A fosfatase alcalina óssea é uma ectoenzima do osteoblasto, com funções não completamente esclarecidas^{4,5}. Sua atividade apresenta correlação razoável com a formação óssea⁵. Os níveis mais altos são geralmente encontrados na Doença de Paget do osso, na qual sua atividade parece ser responsável pela totalidade da fosfatase⁴. No raquitismo e na osteomalácia, o possível efeito da matriz óssea submineralizada sobre a atividade dos osteoblastos é o principal responsável pelo aumento da atividade da enzima².

O objetivo deste estudo é avaliar a atividade da fosfatase alcalina óssea em soros de crianças e adolescentes com osteopenia colestática. Dois métodos diferentes de determinação da atividade enzimática foram estudados: o método da inativação pelo calor e o método da precipitação da lectina por germe de trigo.

MATERIAL E MÉTODOS

Pacientes e controles

Foram estudados prospectivamente 20 pacientes caucasóides, com no mínimo seis meses de colestase, definida clinicamente pela presença de icterícia-colúrica e/ou acolia e/ou prurido e bioquimicamente por hiperbilirrubinemia de reação direta superior a 30% da bilirrubinemia total. Onze pacientes eram do sexo masculino e nove do sexo feminino. A média de idade dos pacientes foi de $8,20 \pm 4,86$ anos, variando de 3 a 18 anos; mediana = 6,0 anos.

Onze pacientes (55%) apresentavam característica clínicas, laboratoriais e histológicas de cirrose. Cirrose criptogênica (não associada à vírus B e C, Doença de Wilson, hepatite auto-imune, deficiência de α_1 anti-tripsina, fibrose cística e outros erros inatos do metabolismo não relacionados a ácidos biliares) e atresia de vias biliares extra-hepática foram os diagnósticos mais prevalentes. Corresponderam respectivamente a 25% e 30% dos diagnósticos. Outros diagnósticos observados foram os seguintes: Síndrome de Alagille (15%); colestase idiopática (15%); hepatite autoimune (10%); deficiência de α_1 anti-tripsina (5%).

Dezesseis indivíduos saudáveis, caucasóides, serviram como controles para atividades de fosfatase alcalina total (FAT) e de sua fração óssea. Onze eram do sexo masculino (68%) e cinco do sexo feminino (32%). A média de idade foi de $6,65 \pm 6,06$ anos, variando de 1,8 a 21 anos, mediana = 4,5 anos.

O diagnóstico de osteopenia foi feito por DEXA.

As características de pacientes e controles são mostradas nas tabelas 1 e 2.

Densidade óssea mineral

A densidade óssea mineral foi determinada por DEXA e os resultados comparados aos valores de normalidade fornecidos pela tabela de Thomas e colaboradores ⁶. Os pacientes foram classificados em osteopênicos de acordo com os padrões do escore Z calculado de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{escore Z} = \frac{\text{DOM* do paciente} - \text{média de DOM para idade e sexo}}{1,96 \text{ desvios-padrão}}$$

*DOM = densidade óssea mineral

Atividade das FAT e FAO

Amostras de soro de vinte pacientes e de dezesseis controles foram coletadas no momento da realização da densitometria e estocadas à - 40° C. Todos obedeciam a um jejum mínimo de quatro horas para evitar interferência da fosfatase alcalina intestinal nas amostras.

Atividade da FAT: a atividade da FAT foi determinada a 25°C, usando o substrato p-nitrofenol fosfato (Merk Lab).

Atividade da FAO: dois métodos foram estudados com o objetivo de se determinar a atividade da FAO.

- Método da inativação pelo calor: considerando a labilidade da fração óssea da fosfatase alcalina ao calor, realizou-se o procedimento como descrito por Moss e Withby ⁷. Cem microlitros de soro foram incubados à 56° C durante dez minutos e transferidos para um banho com gelo. A atividade da fosfatase alcalina não óssea foi então determinada diretamente e a fração óssea indiretamente, calculada subtraindo-se o resultado da primeira do valor da fosfatase alcalina total do soro em estudo.



Atividade da FAO = Atividade da FAT - Atividade da fosfatase alcalina termoestável

- Método da precipitação por lectina: este procedimento foi realizado como descrito por Rosalki e Ying Foo. Baseia-se na ligação da lectina de germe de trigo à porção glicosacarídica da fração óssea da fosfatase alcalina⁸.

Todas as amostras foram pré tratadas com o detergente Triton-X 100 diluído em água destilada na concentração de 200 mg/l, visando extrair os lipídeos presentes na fosfatase alcalina biliar. Cem microlitros de soro mais 10 microlitros da solução de detergente foram incubados a 37°C, por 30 minutos. Após incubação, 10 microlitros desta mistura foram adicionadas a 10 microlitros de lectina de germe de trigo (Sigma) em tubos de Eppendorf e reincubados a 37°C. Após a segunda incubação, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada Janetski K-23. No sobrenadante, determinou-se a atividade da fosfatase alcalina não óssea, sendo que o valor medido foi sempre multiplicado por 2,2 para corrigir a diluição da amostra.

Cerca de 80% da fosfatase alcalina óssea do soro é precipitada por este método, estando os 20% restantes presentes no sobrenadante⁸. A atividade desta fração foi então calculada subtraindo-se o valor corrigido da fosfatase alcalina presente no sobrenadante do valor da fosfatase alcalina total, multiplicando-se este resultado por 1,25 (100/80).

$$\text{Atividade da FAO} = \text{Atividade da FAT} - [(\text{FA do sobrenadante} \times 2,2) \times 1,25]$$

Controle de qualidade dos métodos: a inativação pelo calor foi testada nas condições habituais do laboratório, utilizando-se uma mistura de soros de crianças normais, nos tempos 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos de incubação a 56°C.

Exatidão dos métodos: para demonstrar a exatidão dos métodos, as técnicas foram comparadas, utilizando-se soros provenientes de pacientes adultos com Doença de Paget do osso com atividade conhecida de fosfatase alcalina óssea.

Reprodutibilidade dos métodos: utilizando-se uma mistura de soros de crianças e adolescentes normais, procedeu-se a dez determinações consecutivas da atividade da enzima determinada pelo método do calor e sete, pelo método da precipitação, isto devido à escassez do reagente. A partir destes dados, foi calculado o coeficiente de variação (CV) de cada método. Considerou-se boa reprodutibilidade valores de $CV \leq 10\%$.

O programa estatístico SPSS (*Statistical Package for Social Science*) foi utilizado para avaliar os resultados. O coeficiente de Spearman foi determinado para os estudos de correlação e o teste U de Mann-Whitney para as comparações.

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Pesquisa e Pós-Graduação e Comissão de Ética e Pesquisa em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre de acordo com as normas de pesquisa em saúde vigentes no país.

RESULTADOS

Todos os pacientes elegíveis completaram o estudo. Todos apresentavam icterícia-colúrica e hepatoesplenomegalia. Outros sinais e sintomas de colestase observados foram acolia (40%) e prurido (70%). Um paciente apresentava deformidade óssea: alargamento de epífises em membros inferiores e cifose tóraco-lombar (paciente nº 19).

Densidade óssea mineral

Todos os pacientes apresentaram densidade óssea inferior a dois desvios-padrão da média para idade e sexo, como pode ser observado na fig. 1.

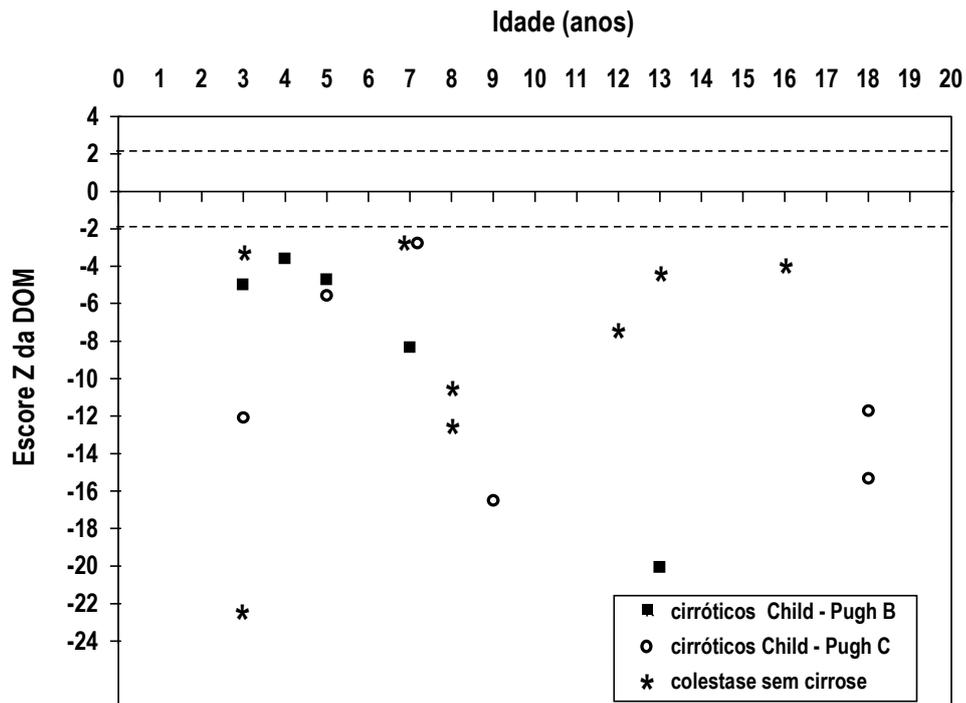


Fig. 1 - Escore Z para densidade óssea mineral em 20 crianças e adolescentes com colestase crônica: comparação entre cirróticos e não cirróticos.

Atividade das FAT e FAO

FAT

Os resultados da atividade da FAT variaram entre 333 U/l a 2080 U/l no grupo de pacientes, sendo a média de $741,1 \pm 384,4$ U/l. Nos controles os resultados se situaram entre 152,0 a 412,0, sendo a média de $274,2 \pm 70,1$ U/l. Foi estatisticamente diferente as médias entre os grupos ($p < 0,0001$). Estes resultados estão discriminados nas tabela 1 e 2.

TABELA I
Características dos pacientes e resultados dos níveis séricos de fosfatase alcalina total (FAT) em 20 crianças e adolescentes com colestase crônica

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Diagnóstico	FAT (U/l)
1	F	9,0	Cirrose Criptogênica	1001,0
2	M	5,5	Atresia de vias biliares extra-hepática	550,0
3	M	15,5	Síndrome de Alagille	911,0
4	F	12,9	Cirrose Criptogênica	432,0
5	F	12,6	Síndrome de Alagille	692,0
6	M	8,4	Síndrome de Alagille	1001,0
7	F	6,9	Colestase Idiopática	775,0
8	F	5,3	Atresia de vias biliares extra-hepática	1064,0
9	M	3,0	Deficiência de α_1 anti-tripsina	421,0
10	M	6,8	Atresia de vias biliares extra-hepática	333,0
11	M	13,3	Hepatite autoimune	475,0
12	F	7,6	Cirrose Criptogênica	599,0
13	M	3,8	Atresia de vias biliares extra-hepática	2080,0
14	M	18,0	Cirrose Criptogênica	555,0
15	F	8,0	Hepatite autoimune	912,0
16	M	18,0	Cirrose Criptogênica	612,0
17	M	3,5	Colestase Idiopática	527,0
18	F	7,5	Atresia de vias biliares extra-hepática	620,0
19	M	3,0	Atresia de vias biliares extra-hepática	838,0
20	F	3,0	Colestase Idiopática	424,5

TABELA II
Sexo e idade nos indivíduos normais : Resultados das
atividades de fosfatase alcalina total (FAT) em
16 crianças e adolescentes normais

Indivíduos	Sexo	Idade (anos)	FAT (U/l)
1	M	6,0	248,0
2	M	4,0	412,0
3	F	3,0	378,0
4	F	3,0	280,0
5	M	15,0	329,0
6	M	21,0	202,0
7	M	20,0	152,0
8	M	2,0	327,0
9	M	3,0	233,0
10	M	3,0	236,0
11	M	3,5	268,0
12	F	4,6	240,0
13	F	4,8	276,0
14	M	1,8	369,0
15	F	3,0	245,0
16	M	3,0	224,0

FAO - Método do calor (Tabelas III e IV)

A atividade da fração óssea da fosfatase alcalina variou de 186,0 U/l a 1623,0 U/l, sendo a média de $594,7 \pm 321,2$. Os resultados nos controles mostravam valores entre 96,0 U/l e 311,0 U/l, sendo a média deste grupo igual a $201,5 \text{ U/l} \pm 61,5 \text{ U/l}$. Foi estatisticamente significativa as diferenças entre os grupos ($p < 0,0001$).

TABELA III

Resultados das atividades de fosfatase alcalina óssea pelo método de inativação pelo calor em 20 crianças e adolescentes com colestase crônica

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Fosfatase alcalina óssea (U/l)
1	F	9,0	816,0
2	M	5,5	465,0
3	M	15,5	796,0
4	F	12,9	384,0
5	F	12,6	582,5
6	M	8,4	760,0
7	F	6,9	638,0
8	F	5,3	856,0
9	M	3,0	238,0
10	M	6,8	186,0
11	M	13,3	415,0
12	F	7,6	535,0
13	M	3,8	1623,0
14	F	18,0	309,0
15	M	8,0	748,0
16	M	18,0	568,0
17	M	3,5	489,0
18	F	7,5	476,0
19	M	3,0	654,0
20	F	3,0	357,0

TABELA IV

Resultados das atividades de fosfatase alcalina óssea pelo método de inativação pelo calor em 16 crianças e adolescentes normais

Indivíduos	Sexo	Idade (anos)	Fosfatase alcalina óssea (U/l)
1	M	6,0	166,0
2	M	4,0	311,0
3	F	3,0	280,0
4	F	3,0	190,0
5	M	15,0	277,0
6	M	21,0	115,0
7	M	20,0	96,0
8	M	2,0	157,0
9	M	3,0	205,0
10	M	3,0	218,0
11	M	3,5	240,0
12	F	4,6	165,0
13	F	4,8	230,0
14	M	1,8	240,0
15	F	3,0	206,0
16	M	3,0	128,0

FAO - Método da precipitação por lectina

Os resultados da atividade da FAO por este método, variaram entre 76,1 U/l a 1306,8 U/l no grupo de pacientes, sendo a média de $404,3 \pm 270,4$ U/l. Nos controles os resultados se situaram entre 106,5 a 342,0, sendo a média de $260,8 \pm 70,3$ U/l. Foi estatisticamente diferente as médias entre os grupos ($p < 0,0001$). Estes resultados estão discriminados nas tabelas V e VI.

TABELA V

Resultados das atividades de fosfatase alcalina óssea pelo método da precipitação por lectina em 20 crianças e adolescentes com colestase crônica

Pacientes	Sexo	Idade (anos)	Fosfatase alcalina óssea (U/l)
1	F	9,0	431,0
2	M	5,5	329,9
3	M	15,5	514,2
4	F	12,9	141,3
5	F	12,6	271,8
6	M	8,4	695,0
7	F	6,9	546,0
8	F	5,3	773,0
9	M	3,0	246,0
10	M	6,8	176,0
11	M	13,3	428,0
12	F	7,6	446,0
13	M	3,8	1306,8
14	M	18,0	212,6
15	F	8,0	496,0
16	M	18,0	281,7
17	M	3,5	428,0
18	F	7,5	480,0
19	M	3,0	95,6
20	F	3,0	76,1

TABELA VI

Resultados das atividades de fosfatase alcalina óssea pelo método da precipitação por lectina em 16 crianças e adolescentes normais

Indivíduos	Sexo	Idade	Fosfatase alcalina óssea
-------------------	-------------	--------------	---------------------------------

		(anos)	(U/l)
1	M	6,0	125,0
2	M	4,0	106,5
3	F	3,0	157,3
4	F	3,0	163,6
5	M	15,0	202,2
6	M	21,0	138,0
7	M	20,0	145,0
8	M	2,0	260,0
9	M	3,0	200,0
10	M	3,0	190,0
11	M	3,5	256,0
12	F	4,6	276,0
13	F	4,8	342,0
14	M	1,8	290,0
15	F	3,0	190,0
16	M	3,0	165,0

Curva de inativação da fosfatase alcalina

Os resultados obtidos pela análise da curva de inativação da fosfatase alcalina realizada nas condições do laboratório, mostra um platô de inativação aos 15 minutos de incubação das amostras a 56°C, como pode ser visto na fig. 2. Esta reproduz os achados originalmente descritos por Moss².

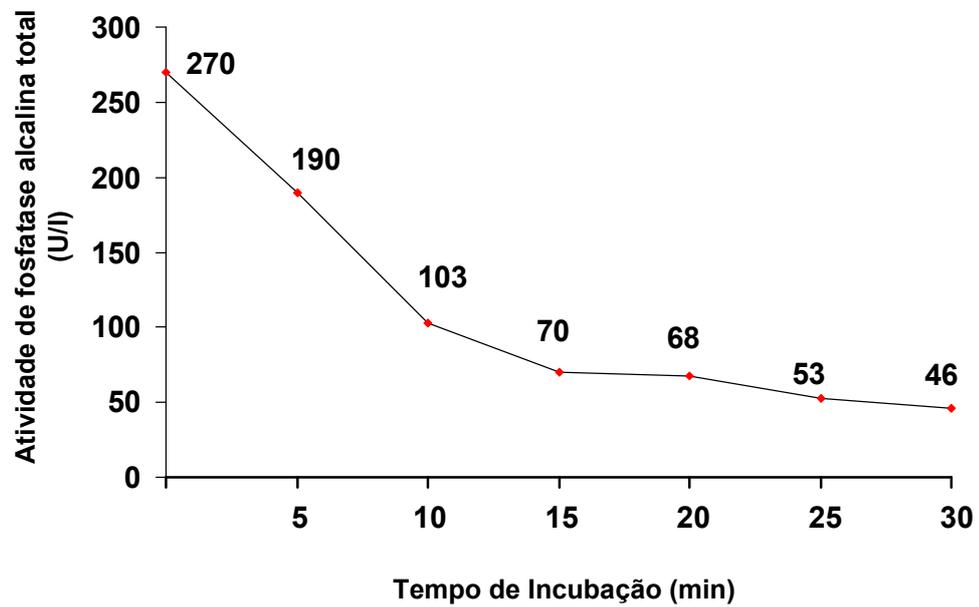


Fig. 2 - Curva de inativação térmica da fosfatase alcalina em 6 diferentes tempos de incubação das amostras a 56°C: soros de crianças e adolescentes normais.

Exatidão dos Métodos

Estes resultados são mostrados na tabela VII. O método do calor “recuperou” em média 95% da atividade da FAO presente nos soros de pacientes com Doença de Paget do osso. Este valor foi de 42,6% quando a técnica de precipitação por lectina foi avaliada.

TABELA VII

Estudo da exatidão dos métodos: comparação entre atividade de fosfatase alcalina total e fosfatase alcalina óssea em soros de pacientes com Doença de Paget pelos métodos de inativação pelo calor e da precipitação por lectina

Pacientes	Fosfatase alcalina total (U/l)	Fosfatase alcalina óssea (U/l)	
		Método do calor	Método da lectina
1	228,0	215,0	184,0
2	900,0	886,0	384,0
3	564,0	500,0	283,0
4	820,0	800,0	190,0

Reprodutibilidade dos Métodos

Os resultados relativos à reprodutibilidade dos métodos são mostrados na tabela VIII. O coeficiente de variação observado foi de 8,6% para a FAT, 4,5% para FAO determinada pelo método do calor e 14,9% para a FAO medida pelo método da precipitação por lectina.

TABELA VIII
Estudo da reprodutibilidade dos métodos: determinação do coeficiente de variação dos métodos

Determinações	Fosfatase alcalina total (U/l)	Fosfatase alcalina óssea (U/l)	
		Método do calor	Método da lectina
1	362,5	300,0	128,9
2	360,2	269,7	192,9
3	354,2	307,8	127,9
4	386,1	240,9	144,4
5	335,2	313,0	155,9
6	298,9	317,0	143,9
7	354,3	314,0	133,4
8	290,6	311,4	-
9	348,7	321,2	-
10	369,1	315,4	-
Média (U/l)	345,9	307,6	146,7
Desvio Padrão (U/l)	29,9	14,0	22,7
Coeficiente de variação	8,6	4,5	14,9

Estudos de Correlação

Correlação entre os métodos: o coeficiente de correlação entre os métodos foi de 0,74, o que corresponde a uma boa correlação com significância estatística ($p < 0,0001$).

DISCUSSÃO

Existem diversas maneiras de se estimar qualitativa ou semi-quantitativamente a atividade da fosfatase alcalina esquelética. Estas incluem inativação pelo calor ou substâncias como a uréia, fenilalanina ou hidroxiamina, solubilidade em etanol ácido, precipitação por lectina de germe de trigo, eletroforese e mais recentemente, técnicas de imunoradiometria que incluem anticorpos monoclonais específicos ^{4,9}. Desde o primeiro relato em 1962, da maior estabilidade da fosfatase alcalina hepática ao calor, têm surgido diversos estudos de inativação seletiva ^{1,2,10}. A maioria refere-se ao uso da uréia ou do calor como agente de inativação. Os métodos de inativação pelo calor diferem quanto à temperatura utilizada e o tempo de inativação estudado. Em um procedimento típico, atividade residual menor que 20% da fosfatase após incubação por 10 minutos a 56°C sugere que a amostra contenha predominantemente fosfatase alcalina óssea ². A eletroforese é a técnica que quando realizada isoladamente se mostra mais útil para análise qualitativa das múltiplas formas da fosfatase alcalina no soro. Entretanto, há superposição entre os picos eletroforéticos das formas óssea e hepática à quantificação por densitometria óptica ⁹. Baseados no fato, de que as frações óssea e hepática são diferentemente glicosiladas, Rosalki e colaboradores testaram o efeito da lectina de germe de trigo (uma proteína altamente específica e com grande capacidade de se ligar a carboidratos) sobre amostras ricas em fosfatase alcalina e observaram que a fração óssea é precipitada por este método ⁸. As técnicas com anticorpos monoclonais parecem ter resultados superiores aos outros métodos, mas ainda não são universalmente disponíveis.

A fosfatase alcalina óssea está localizada na membrana do osteoblasto e é liberada para a circulação por um mecanismo vesicular não totalmente esclarecido ^{5,12}. Parece estar

envolvida na clivagem extracelular de pirofosfato, um potente inibidor da deposição de pirofosfato de cálcio ⁵. Sua atividade sérica é proporcional à formação do colágeno e geralmente correlaciona-se bem com o crescimento ósseo e com doenças ósteo-metabólicas de alto e baixos *turnover* ^{4,5}.

A diferença significativa encontrada por nós entre controles e pacientes, sugere estar o aumento da atividade enzimática relacionada à presença de doença óssea metabólica nos últimos, também sugerida pela avaliação radiológica.

Osteopenia colestática ou osteodistrofia hepática é uma situação de causa ainda desconhecida ^{13,14}. Alguns autores têm sugerido, a existência de disfunção osteoblástica ^{14,15}. Elevação de fosfatase alcalina esquelética em nossos pacientes parece corroborar este pensamento. Resta-nos discutir, os métodos disponíveis de determinação desta enzima, disponíveis em nosso meio.

Na nossa experiência, o método de inativação pelo calor foi superior ao método da precipitação por lectina, concordando com os resultados encontrados por Farley e colaboradores ⁴.

As lectinas são proteínas que reagem com certas estruturas de carboidratos, ligando-se a estas. A lectina de germe de trigo reage tanto com a N-acetil glicosamina quanto com o ácido N-acetilneuramínico ¹⁶. A fosfatase alcalina é uma glicoproteína, sendo as formas hepática e óssea, produtos de um único gene estrutural ¹⁷. As suas modificações pós-translacionais estão possivelmente relacionadas às suas cadeias de carboidratos e à presença de distintas glicosiltransferases localizadas em suas membranas que modificam a molécula enzimática e fornecem especificidade tissulares ¹⁶. Deste modo, a forma óssea é precipitada por esta proteína, enquanto a hépato-biliar e a placentária não o são - este é o fundamento do método da precipitação por lectina descrito por Rosalki e colaboradores ⁸. Estes autores estudaram soros de indivíduos saudáveis, indivíduos com doença hépato-biliar, doença de

Paget e gestantes, e demonstraram que o método era de fácil execução, tinha boa correlação com a clínica e boa reprodutibilidade ($CV = 5,1\%$). Behr e colaboradores encontraram resultados semelhantes, ressaltando no entanto resultados falso positivos em casos de hepatite aguda ¹⁶. Rauch em estudo recente, não conseguiu demonstrar elevação significativa da fosfatase alcalina óssea em 16 crianças e adolescentes com colestase crônica, realizando este método ¹⁷.

Na nossa experiência, o método da precipitação mostrou-se bastante laborioso e pouco preciso ($CV > 10\%$). Quando testado nos soros de pacientes com Doença de Paget, se mostrou pouco exato, sendo capaz de identificar somente 42,6% da fosfatase alcalina óssea presente. Farley e colaboradores ⁴, observaram com a utilização deste método, baixas recuperação e especificidade, não sendo capaz de identificar a presença da enzima tanto em soros de pacientes com Doença de Paget quanto em soros de pacientes com osteossarcoma. Gonchoroff e colaboradores ¹⁸, utilizando lectina da mesma procedência da utilizada por nós, não conseguiu diferenciar as formas hepáticas e óssea da fosfatase alcalina. Os dois estudos sugerem a existência de uma afinidade intermediária entre estas duas formas de fosfatase alcalina e a lectina, desde que a enzima possui cinco sítios possíveis de glicosilação, alguns provavelmente comuns a formas enzimáticas determinadas por um único gene.

Em resumo, este método de determinação da atividade da FAO é, na nossa experiência, um método oneroso, cujas precisão e exatidão não justificam o seu uso rotineiro.

Estudos de Moss e colaboradores ² demonstraram que sob condições comparáveis de aquecimento (10 min a 56°C), a fosfatase alcalina óssea perde sua atividade mais rapidamente do que sua enzima hepática. Algumas críticas têm sido feitas ao método de inativação pelo calor. A maioria refere-se à complexidade e à pouca sensibilidade do método relacionadas às variações de temperatura e de pH a que está sujeito ⁹.

Estabelecemos controles precisos da temperatura e do tempo de incubação. Realizamos uma curva de inativação da fosfatase alcalina e encontramos resultados semelhantes aos descritos, originalmente².

O coeficiente de variação do procedimento realizado por nós encontra-se em concordância com aqueles preconizados na literatura, para este método¹⁹. Isto demonstra que o método é preciso. Quanto à exatidão, nossos resultados se assemelham àqueles observados por Farley e colaboradores⁴, sendo capaz de identificar mais de 90% da FAO presente nos soros de pacientes com Doença de Paget.

O método da inativação pelo calor nos parece simples, não oneroso, facilmente realizado em laboratório de análises clínicas e superior ao método da precipitação por lectina.

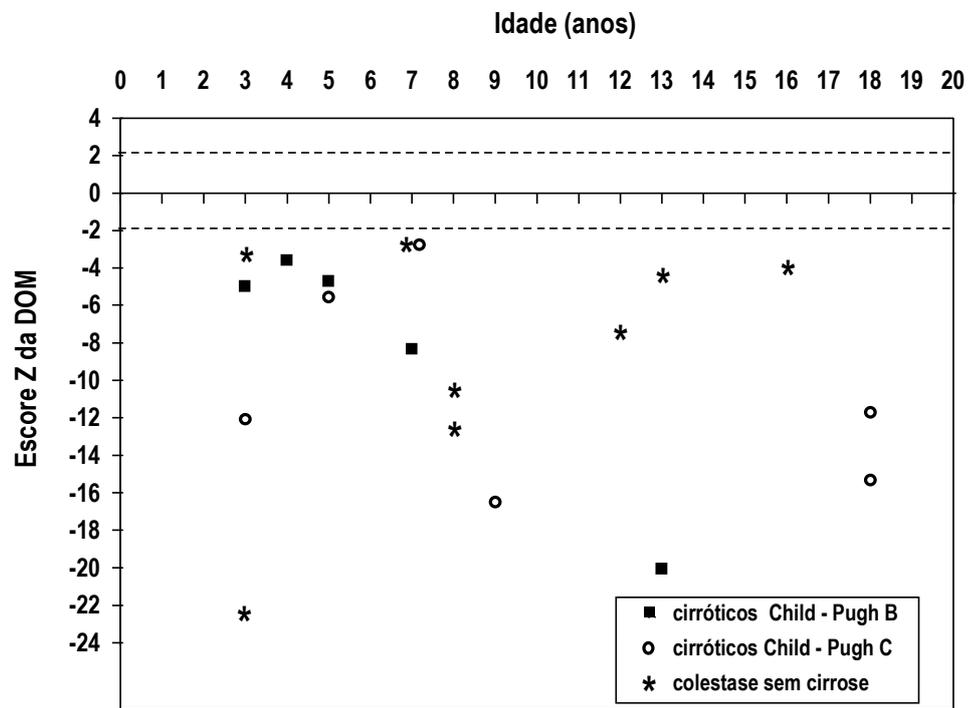
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

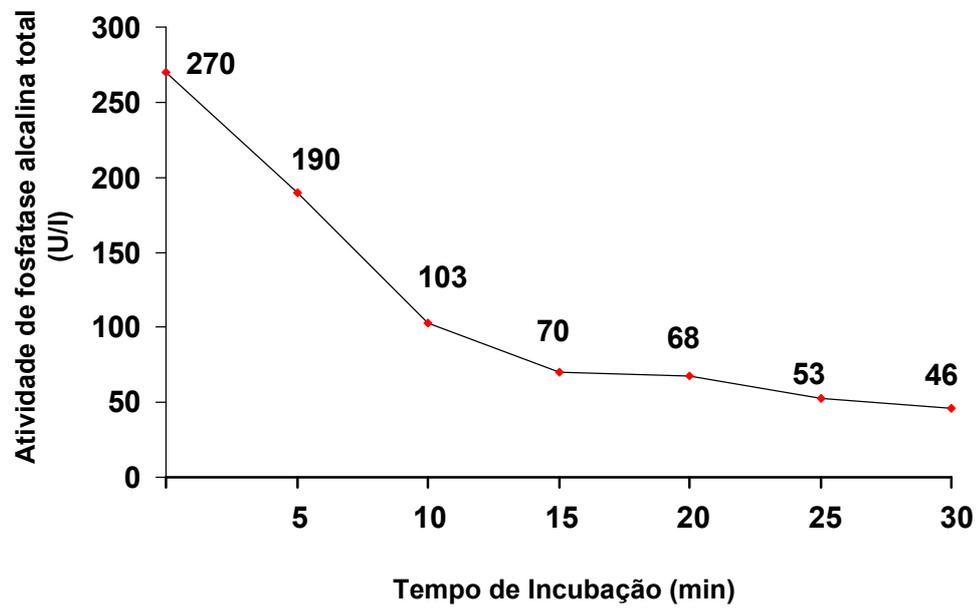
1. **Siqueira, A.J.S.; Barbosa E.D.S.F.; Azevedo, A.M.P.; et al.** Técnica simples para identificar a origem da atividade da fosfatase alcalina no soro com o emprego da uréia como inibidor seletivo. *Laes & Haes* 1995; 92: 961-971.
2. **Moss, D.W.** Enzyme tests in diseases of bone. In: The principles and practice of diagnostic enzymology. 1^a ed. London. Edward Arnold, 1976; 399-422.
3. **Crofton, P.M.; Stirling, H.F.; Kelnar, C.J.H.** Bone alkaline phosphatase and height velocity in short normal children undergoing growth-promoting treatments: longitudinal study. *Clin Chem*, 41:672-678, 1995.
4. **Farley, J.R.; Hall, S.L.; Ilacas, D.; et al.** Quantification of skeletal alkaline phosphatase in osteoporotic serum by wheat germ agglutinin precipitation, heat inactivation and a two-site imunorradiometric assay. *Clin Chem*, 40:1749-1756, 1994.
5. **Risteli, L.; Risteli, J.** Biochemical markers of bone metabolism. *Ann Med*, 25:116-121, 1993.
6. **Thomas, K.A.; Cook, S.D.; Bennet, J.T.; et al.** Femoral neck and lumbar spine bone densities in a normal population 3-20 years of age. *J Paediatr Orthop*, 11:48-58, 1991.
7. **Moss, D.W.; Whitby, L.G.** A simplified heat inactivation method for investigating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chem Acta*, 61:63-71, 1975.
8. **Rosalki, S.B.; Ying - Foo, A.** Two new methods for separating and quantifying bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes and plasma. *Clin Chem*, 1182-1186, 1984.
9. **Panighari, K.; Delmas, P.D.; Singer, F.; et al.** Characteristics of two-site imunorradiometric assay for human skeletal alkaline phosphatase in serum. *Clin Chem*, 40: 822-828, 1994.
10. **Moss, D.W.; Withby, L.G.** Analysis of heat inactivation curves of alkaline phosphatase isoenzymes in serum. *Clin Chem*, 59: 361-367, 1975.

11. **Moss, D.W.** Alkaline phosphatase isoenzymes. *Clin Chem*, 28:2007-2016, 1982.
12. **Delmas, P.D.** Biochemical markers of bone turnover I: Theoretical considerations and clinical use in osteoporosis. *Am J Med*, 95:115-165, 1993.
13. **Hay, J.E.** Bone disease in cholestatic liver disease. *Gastroenterology*, 108: 276-283, 1995.
14. **Sherlock, S.** Cholestasis. In: Sherlock, S. & Dolley, D. Diseases of the liver and biliary system, 10 ed., Oxford, Blackwell, 1997, p 217-237.
15. **Diamond, T.H.; Stiel, D.; Lunzer, M.; et al.** Hepatic osteodystrophy: static and dynamic bone histomorphometry and serum bone Gla-protein in 80 patients with chronic liver disease. *Gastroenterology*, 96: 213-221, 1989.
16. **Behr, W.; Barnert, J.** Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. *Clin Chem*, 32: 1960-1965, 1986.
17. **Rauch, F.; Middelman, B.; Cagnoli, M.; et al.** Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone-specific alkaline phosphatase in childhood and adolescence. *Acta Paediatr*, 86: 583-587, 1997.
18. **Gonchoroff, D.G.; Branun, E.L.; O'Brien, J.F.** Alkaline phosphatase isoenzymes of liver and bone are incompletely resolved by wheat-germ lectin affinity chromatography. *Clin Chem*, 35:2-32, 1989.
19. **Valenzuela, G.J.; Munson, L.A.; Farley, J.R.; et al.** Time-dependent changes in bone, placental, intestinal and hepatic alkaline phosphatase activities in serum during human pregnancy. *Clin Chem*, 18: 995-1012, 1981.

Fig. 1 - Escore Z para densidade óssea mineral em 20 crianças e adolescentes com colestase crônica: comparação entre cirróticos e não cirróticos.

Fig. 2 - Curva de inativação térmica da fosfatase alcalina em 6 diferentes tempos de incubação das amostras a 56°C: soros de crianças e adolescentes normais.





***Mycobacterium kansasii* em paciente imunocompetente**

Paulo Fausto Cauduro (*)

Adelina Mezzari (*)(**)

Tereza Cristina Brodt (*)

(*) Setor bacteriologia Laboratório Weinmann, Porto Alegre

(**) Professor auxiliar, Departamento Análises Faculdade de Farmácia UFRGS

Professor assistente, Departamento de Microbiologia e Parasitologia Fundação

Faculdade Federal de Ciências Médicas de Porto Alegre

Endereço para correspondência:

Paulo Fausto Cauduro

Laboratório Weinmann

Ramiro Barcelos, 910 - 5º andar

CEP: 90035-001, Porto Alegre, RS

fone: 314 38 46

SINOPSE:

É apresentado a detecção de micobactéria não tuberculosa (MNT) - *Mycobacterium kansasii* - em paciente imunocompetente. A amostra foi isolada a partir de lavado bronco alveolar (LBA) e lavado brônquico (LB). A identificação final foi obtida com sonda de DNA quimioluminescente (AccuProbe (®) *Mycobacterium kansasii* Culture Identification Test - Gen Probe, San Diego, Ca, USA)

UNITERMOS: Micobactéria não tuberculosa, imunocompetente, lavado bronco alveolar, lavado brônquico

ABSTRACT

We report a case of a nontuberculous mycobacteria (NTM) - *Mycobacterium kansasii* - isolated from bronchoalveolar and bronchial washing of an immunocompetent patient. The final identification was done with DNA chemiluminescence probe (Accu Probe (®) *Mycobacterium kansasii* Culture Identification Test - Gen Probe, San Diego, Ca, USA)

KEY WORDS: Nontuberculous mycobacteria, immunocompetent, bronchoalveolar washing, bronchial washing

INTRODUÇÃO

Na antiga classificação de Runyon (1954), o *Mycobacterium kansasii* é catalogado como fotocromogênico patogênico, associado a doenças pulmonares. São microrganismos capazes de produzir pigmento amarelo ou laranja em meio de Loewenstein-Jensen quando expostos à luz. A denominação foi proposta por Haudroy (1955) mas outras tem sido usadas para identificar organismos que exibem tais características: bacilos amarelos (Büller e Pollak, 1953), *Mycobacterium luciflavum* (Middlebrook, 1956) e Grupo I de Runyon.

A denominação “atípica” para este grupo de micobactérias, originou-se da crença errônea que tais bactérias fossem amostras de *M. tuberculosis* não usuais.

Em 1979, Wolinsky (1) apresentou em revisão, a evidência que as micobactérias não tuberculosas são capazes de produzir doença e Davidson, 1981, (2) estimulou as pesquisas sobre esses microrganismos e relatou as conclusões iniciais dos estudos da epidemiologia, patogenicidade, taxonomia e genética molecular destas micobactérias. Antes do advento da AIDS, a doença causada por micobactérias não tuberculosas (MNT), era pulmonar, confinada aos linfonodos cervicais e em raros casos, disseminada (1).

A maioria dos pacientes apresentava condições pulmonares predisponentes ou trabalhava exposta à poeira ou cisco. Na ausência de evidência de transmissão pessoa-a-pessoa, foi sugerido que os pacientes eram infectados de fontes ambientais por aerossóis. Havia predominância desta ou daquela espécie de acordo com os locais: *M. kansasii* foi na maior parte das vezes urbano com muitos casos nos Estados Unidos central ao passo que *M. intracellulare* e *avium* predominavam no sudoeste e zona rural (3).

Com a emergência da AIDS o quadro da doença por MNT mudou radicalmente. Cerca de 25 a 50% de pacientes com AIDS nos Estados Unidos e Europa são infectados com MNT e

este número tem se elevado desde os primeiros relatos de doença por MNT em paciente com AIDS em 1982 (4). As MNT são oportunistas patogênicos.

Infecções por *M. kansasii* e outros tem sido caracterizadas por nódulos sub-cutâneos ou abscessos. Na maioria dos casos de infecção pulmonar em indivíduos imunocompetentes, há alguma condição predisponente (1). A AIDS tem tido notável efeito na frequência da doença causada por espécies de MNT, especialmente com o complexo *M. avium*, mas não necessariamente com *M. kansasii*.

Em certas regiões do mundo, antes da AIDS as infecções por *M. kansasii* eram mais comuns que as causadas por *M. avium* (5).

As MNT clinicamente significativas incluindo *M. kansasii* e outros provocam quatro síndromes clínicas: doença pulmonar, linfadenite, doença de pele ou tecidos moles e disseminação em pacientes com AIDS. Estas síndromes tem aumentado sua frequência, particularmente em imunodeprimidos. As infecções cutâneas podem simular uma esporotricose e frequentemente estão associadas com doenças sistêmicas, imunossupressão, patologia de pele ou contato com água contaminada (6).

Nachankin, et col (1992) (7) relatam o isolamento de *M. kansasii* em três pacientes, dois com infecção respiratória e um com abscesso periretal, sendo os isolados fenotipicamente similares às cepas de *M. kansasii* porém niacina positivo. Este fenotipo já tinha sido relatado duas vezes na literatura nos anos 1960.

Entre a população HIV negativo o *M. kansasii* é o mais comum agente de doença pulmonar não tuberculosa e meningite (8,9,10).

Há numerosos relatos documentando a presença de *M. kansasii* em amostras de água; raramente tem sido isolado do solo (5,11,12). Amostras isoladas em minas de carvão das províncias de Limburg e Rotterdam foram de mesmo tipo fágico das encontradas no sistema de distribuição de água potável na Holanda (13). Diversos outros relatos narram o isolamento

desta micobactéria em água corrente ou água encanada (11,12). Foi demonstrada a sobrevivência de *M. kansasii* na água por 12 meses e sua incapacidade vital no solo, sugerindo que as MNT são adquiridas do ambiente sem reservatório ainda bem definidos (14). Estes relatos sugerem a hipótese de que a infecção por *M. kansasii* ocorra via aerossol (15).

O presente trabalho relata um caso de isolamento de *M. kansasii* em lavado bronco alveolar e lavado brônquico de paciente imunocompetente com diagnóstico de micobacteriose pulmonar e infecção respiratória de repetição.

CASO CLINICO

Paciente E.A. A., 32 anos, masculino, branco, casado, técnico em eletrônica, residente em Cachoeirinha, RS (Grande Porto Alegre).

História passada: Informa que sempre foi doente, vivendo em permanente tratamento médico. Desde os primeiros meses de vida apresentou diarreia crônica e teve o diagnóstico de “Síndrome de má absorção”. Febre reumática com dois anos de idade. Infecções de vias aéreas superiores e inferiores de repetição. Doenças próprias da infância foram muito agressivas, varicela necessitou de hospitalização; caxumba teve como complicação encefalite.

Apresentou quadro de meningite fúngica aos 7 anos de idade. Há 2 anos, novo quadro de meningite fúngica, tratada com fluconazol por 3 meses. Refere quadro de pneumonia há 3 anos.

Realizou diversas avaliações, não logrando diagnóstico definitivo. HIV não reagente. Níveis séricos de imunoglobulinas A, G, M e E normais. Não é diabético. O quadro atual iniciou com tosse, escarro hemoptóico, dor no hemotórax direito, anorexia e acentuação de sua diarreia. Ao exame físico, abatido, emagrecido (1,55 m - 35 kg), febril (37,5 °C), murmúrio vesicular reduzido nas bases e presença de estertores roncantes esparsos à ausculta do tórax. RX de tórax e Tomografia Computadorizada de tórax demonstraram a presença de infiltração, estrias e consolidações nos espaços aéreos respiratórios dos lobos superiores e inferiores, com bronquiectasias cilíndricas e císticas, principalmente nos segmentos posterior do lobo superior direito, ápico-posterior do lobo superior esquerdo, segmento superior do lobo inferior esquerdo e pirâmide basal direita. Com o diagnóstico de bronquiectasias e suspeita de tuberculose pulmonar foi submetido a Fibrobroncoscopia e lavado bronco alveolar (LAB). Os achados endoscópicos foram compatíveis com a presença de processo inflamatório crônico de

vias aéreas inferiores. A pesquisa direta de bacilo álcool resistente foi negativa e o exame cultural revelou a presença de *Mycobacterium kansasii*.

O paciente iniciou tratamento com rifampicina, hidrazida e pirazinamida obtendo rápida melhora clínica e radiológica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram colhidos amostras de lavado bronco alveolar (LBA) e lavado brônquico (LB). Em ambos os materiais foram pesquisados bacilos ácido álcool resistentes (BAAR) pelo exame direto corado pelo Ziehl Neelsen e após descontaminação pelo método Petroff (16), semeados em meio de Loewenstein-Jensen e incubados a 37 °C. Pesquisa de *M. tuberculosis* foi realizada por PCR (Amplicor Mycobacterium tuberculosis Test - Roche Diagnostic Systems, Inc., Branchburg, N. I., USA), a partir do crescimento em Loewenstein Jensen.

A cultura foi enviada ao Laboratório Fleury (S. Paulo) para confirmação da espécie. O isolado foi então submetido a um teste que utiliza sonda de DNA quimioluminescente (AccuProbe (R) Mycobacterium kansasii Culture Identification Test - Gen Probe, San Diego, Ca, USA).

RESULTADOS

A pesquisa direta de BAAR das amostras de LBA e LB, foram negativas. O PCR para *Mycobacterium tuberculosis* foi negativo. O crescimento em Loewenstein Jensen deu-se em doze dias. A morfologia das colônias apresentaram características morfológicas de *Mycobacterium sp*; mantido a temperatura ambiente e exposto à luz, desenvolveu forte pigmento amarelo e consistência viscosa. O resultado confirmatório fornecido pelo Laboratório Fleury por sonda de DNA foi *Mycobacterium kansasii*.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

M. kansasii apresenta crescimento lento, é fotocromogênico (colônia sem pigmento carotenóide, amarelo, quando cultivada na ausência de luz e pigmentada após exposição à luz e reincubada), não cresce a 45 °C e temperatura ótima de reprodução de 32 a 42 °C. Os isolados produzem catalase e nitrato redutase e hidrolisam Tween 80. As espécies com forte catalase correspondem às mais virulentas (17). Semelhantes à outras MNT, isolados individuais demonstram variação colonial sendo a base genética desta variação, desconhecida (5).

M. kansasii demonstrou alguma diversidade genética, tanto em estudos envolvendo sondas de DNA quanto em estudos que utilizaram Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP). A análise dos padrões de RFLP indicam cinco diferentes padrões que parecem obedecer distribuição geográfica específica (5).

A bacteremia por *M. kansasii* pode ser diagnosticada utilizando sistema automatizado BACTEC 12B Medium 12B (Becton Dickson Diagnostic Instrument Systems) (18) e a sensibilidade pode ser estabelecida pelo teste do E test (19).

As cepas de *M. kansasii* isoladas tem sido sensíveis ao Ethambutol, Isoniazida e Rifampicina (8,10).

Mycobacterium kansasii, micobactéria não tuberculosa, teve como fator predisponente, as infecções respiratórias de repetições deste paciente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WOLINSKY, E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1979; 119:107-159.
2. DAVIDSON, P.T. International conference on atypical mycobacteria. *Rev. Infect. Dis.*, 1981; 3:813-1103.
3. AHN, C.H.; LOWELL, J.R.; ONSTAD, G.D.; SHUFORD, E.H., HURST, G.A. A demographic study of disease due to *Mycobacterium kansasii* on *M. intracellulare-avium* in Texas. *Chest*, 1979;75:120-125.
4. ZAKOWSKI, P.; FLIGIEL, S.; BERLIN, G.W., JOHNSON, L. Disseminated *Mycobacterium avium-intracellulare* infection in homosexual men dying of acquired immunodeficiency. *J.A.M.A.*, 1982; 248:2980-2982.
5. FALKINHAM III, J.O. Epidemiology of Infection by Nontuberculous Mycobacteria. *Clin Bacteriol. Rev.*, 1996; 9(2):177-215.
6. BREATHNACH, A.; LEVELL, N.; MUNRO, C.; NATARAJAN, S. PEDLER, S. Cutaneous *Mycobacterium kansasii* infection: case report and review. *Clin. Infect. Dis.*, 1995.20(4): 812-817.
7. NACHAMKIN, I.; MACGREGOR, R.R. et col. Niacin-positive *Mycobacterium kansasii* isolated from immunocompromised patients. *J. Clin. Microbiol.*, 1992; 30(5):1344-1346.
8. EVANS, S.A.; COLVILLE, A.; EVANS, A.J.; CUSP, A.J., JOHNSTON, I.D. Pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection: comparison of the clinical features, treatment and outcome with pulmonary tuberculosis. *Thorax*, 1996; 51(12):1248-1252.
9. FLOR, A.; CAPDEVILA, J.A.; MARTIN, N.; GAVALDA, J. PAHISSA, A. Nontuberculous mycobacterial meningites: report of two cases and review. *Clin. Infect.*

- Dis., 1996; 23(6):1266-1273.
10. FRENCH, A.L.; BENATOR, D.A., GORDIN, F.M. Nontuberculous Mycobacterial infections. *Med. Clin. North. Am.*, 1997; 81(2):361-379.
 11. BAILEY, R.K.; WYLES, S.; DINGLEY, M.; HESSE, F. KENT, G.W. The isolation of high catalase *Mycobacterium kansasii* from tap water. *Am. Rev. Resp. Dis.* 1970; 110:115-125.
 12. KAUSTOVA, J.; OLSOVSKY, Z.; KUBIN, M.; ZATLOVKAL, O.; PELIKAN, M. HRADIL, J. Endemic occurrence of *Mycobacterium kansasii* in water supply systems. *J. Hyg. Epidemiol. Microb. Immunol.*, 1981; 25:24-30.
 13. ENGEL, H.W.B.; BERWOLD, L.G., HAVELAAR, A.H. The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tap water. *Tubercle*, 1980; 61:21-26.
 14. HORSBURGH, C.R. Jr. Epidemiology of disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Semin. Respir. Infect.*, 1996; 11(4):244-251.
 15. COLLINS, C.H. , YATES, M.D. Infection and colonisation by *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium xenopi*: aerosols as a possible source?. *J. Infect.*, 1984; 8:178-179.
 16. CAUDURO, P.F., MEZZARI, A. *Bacteriologia e Micologia no laboratório, Merck*, 1989.
 17. STEADHAM, J.E. High catalase *Mycobacterium kansasii* isolated from water in Texas. *J. Clin. Microbiol.*, 1980; 11:496-498.
 18. CONVILLE, P.S.; ANDREWS, J.W., WITEBSKY, F.G. Effect of PANTA on growth of *Mycobacterium kansasii* in BACTEC 12B medium. *J. Clin. Microbiol.*, 1995; 33(8):2012-2015.
 19. FABRY, W.; SCHMID, E.N., ANSORG, R. Comparison of the E test and a proportion dilution method for susceptibility testing of *Mycobacterium kansasii*. *Chemotherapy*, 1995; 41(4):247-252.

Porto Alegre, 29 de abril de 1999

Ao

Editor da Revista RBAC

Estamos enviando mais um trabalho para avaliação e publicação nesta revista

Atenciosamente

Paulo Fausto Cauduro

***MYCOBACTERIUM KANSASII* - REVISTA RBAC**

Enviado em 29/04/99

**Polimorfismo Ava II do gene do receptor da LDL: um marcador genético útil
na avaliação da resposta terapêutica em indivíduos hipercolesterolêmicos***

**Ava II polymorphism at the LDL receptor gene: an useful genetic marker for evaluation of
the pharmacological response in hypercholesterolemic individuals**

Luis A. Salazar¹, Mário H. Hirata¹, Éder C.R. Quintão² & Rosario D.C. Hirata¹

*Trabalho apresentado no XXVI CBAC, Goiânia, GO, 30 de maio a 3 de junho de 1999

¹Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e ²Laboratório de Lípidos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

Endereço para Correspondência: Prof. Luis A. Salazar Navarrete. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, FCF, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 580 CEP 05508-900, São Paulo, SP, Brasil. Fax (011) 813-2197, e-mail: luisn@usp.br

RESUMO - A natureza polimórfica do gene do receptor da Lipoproteína de Baixa Densidade (RLDL) já foi previamente demonstrada pela identificação de vários polimorfismos nesse locus. Entretanto, o efeito dessas alterações genéticas sobre as concentrações séricas de lipídios e a resposta ao tratamento farmacológico da hipercolesterolemia precisa de estudos mais específicos. Nesse trabalho foi avaliado o efeito do polimorfismo *Ava* II (exon 13) do gene do RLDL sobre a resposta ao tratamento com Fluvastatina (inibidor da enzima HMG-CoA redutase) em 55 indivíduos hipercolesterolêmicos (36 a 70 anos). O DNA genômico foi extraído dos leucócitos sangüíneos pela técnica de precipitação salina. A região polimórfica *Ava* II do gene do RLDL foi amplificada pela técnica de PCR e analisada por isotipagem enzimática. Nesses indivíduos, o genótipo homozigoto para a presença de sítios de restrição (A+A+) foi associado a concentrações séricas mais altas de colesterol total, LDL-C, VLDL-C e apoB-100 ($p=0,0001$) quando comparado aos outros genótipos. Adicionalmente, indivíduos portadores do genótipo A-A- apresentaram uma melhor resposta terapêutica à Fluvastatina ($P < 0,05$). Os resultados indicam que o polimorfismo *Ava* II do RLDL contribui para a variabilidade dos lipídeos séricos no grupo estudado, constituindo-se um marcador genético útil na avaliação precoce de risco para as doenças cardiovasculares e para o seguimento da terapia hipocolesterolemizante.

PALAVRAS-CHAVE- gene do receptor da LDL; fluvastatina; polimorfismo *Ava* II; colesterol sérico; genética

SUMMARY- Several DNA polymorphisms have been identified in the Low-density lipoprotein receptor (LDLR) gene, but their significance in affecting plasma cholesterol levels and response to pharmacological treatment in moderate hypercholesterolemic individuals need more specific studies. We have studied the effect of *Ava II* polymorphism (exon 13) at the LDLR gene on serum lipid levels and response to fluvastatin (HMG-CoA reductase inhibitor) treatment. DNA samples were screened from 55 hypercholesterolemic patients (36 to 70 years old), who had previously participated in a multicentre study. The *Ava II* polymorphism was detected by PCR-RFLP. The results shown that A+A+ genotype for *Ava II* polymorphism (homozygous for presence of restriction site) was strong associated with high levels of total cholesterol, LDL-C, VLDL-C and apoB-100 levels ($p=0.0001$). Moreover, individuals carrying the A-A- genotype presented a higher reduction of serum lipid levels when treated with Fluvastatin ($P < 0.05$). In conclusion, this study demonstrates the influence of *Ava II* polymorphism of the LDLR on serum lipid levels and pharmacological response to fluvastatin treatment in hypercholesterolemic subjects from Brazil. These data suggest that LDLR polymorphism can be useful as a genetic marker and probably predict a pharmacological treatment response for hypercholesterolemic subjects.

KEY WORDS- Low-density lipoprotein receptor gene; fluvastatin; *Ava II* polymorphism; Cholesterol Levels; Genetics

INTRODUÇÃO

As dislipidemias, particularmente a hipercolesterolemia, estão entre os mais importantes fatores de risco da doença cardiovascular aterosclerótica, integrando o conjunto das doenças crônico-degenerativas com história natural prolongada, tais como a hipertensão, a obesidade e a *diabetes mellitus*¹⁻³. Estas doenças guardam, entre si, complexa relação, tendo em comum em suas etiologias, entre outras, o estilo de vida e a herança genética.

Estudos clínicos e epidemiológicos têm demonstrado ocorrer um incremento linear na mortalidade, por doença coronariana, com o aumento das concentrações séricas de colesterol^{1, 3-5}. Fatores dietéticos e genéticos influenciam significativamente os valores séricos de colesterol, mas investigações detalhadas sobre estas interações, ainda requerem maiores esclarecimentos.

As técnicas moleculares permitem estudar com mais detalhes os fatores genéticos (mutações e polimorfismos) envolvidos nas alterações do metabolismo lipídico, demonstrando o envolvimento de diversos genes⁶⁻¹³. Dentre os quais, o gene do Receptor da Lipoproteína de Baixa Densidade (RLDL) é um dos mais importantes.

O receptor da LDL desempenha uma função crucial, fazendo parte do mecanismo de remoção das lipoproteínas do plasma e do fornecimento de colesterol e triglicerídeos para as células. Por isso, o RLDL é responsável pela manutenção da homeostase dos lipídeos e das lipoproteínas no plasma e tecidos, e ao mesmo tempo protege as células do acúmulo desses lipídeos, principalmente do colesterol¹⁴. Além disso, a identificação das alterações genéticas no RLDL pode ser de muita utilidade na avaliação da predisposição à aterosclerose e às doenças cardiovasculares.

Estudos recentes têm sugerido que alterações presentes em vários genes que codificam proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, levando os indivíduos a uma maior ou menor

suscetibilidade à doenças cardiovasculares, sendo denominados de genes que predis põe ao desenvolvimento da aterosclerose^{7, 11}. Várias evidências mostram que mutações nos genes de apolipoproteínas ou de receptores, envolvidos no metabolismo lipoprotéico, podem resultar em distúrbios caracterizados por hiper ou hipolipoproteinemia, alguns dos quais podem levar ao desenvolvimento da aterosclerose precoce.

No gene do RLDL foram caracterizadas mais de 300 mutações que causam Hipercolesterolemia Familiar¹⁵⁻¹⁸. Adicionalmente, têm sido identificadas outras alterações no gene do RLDL, conhecidas como polimorfismos, as quais também têm sido associadas com a variabilidade das concentrações plasmáticas de lipídeos, particularmente com os níveis de colesterol total e LDL-C¹⁹⁻²². Através da técnica de Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP), vários sítios de restrição polimórficos no gene do receptor da LDL foram identificados¹⁹⁻²⁵. Algumas dessas regiões polimórficas identificadas nos diferentes exons e introns do gene do RLDL são: extremidade 5': *Bsm* I, intron 3: *Apa* LI, intron 4: *Taq* I, exon 7: *Sph* I, intron 6: *Sph* I, exon 8: *Stu*I, exon 11: *Stu*I, exon 12: *Hinc* II, exon 13: *Ava* II, intron 15: *Pvu* II, *Spe* I e *Apa* LI, exon 18: *Msp* I e *Nco* I, extremidade 3': *Apa* LI e *Pst* I.

A utilidade desses polimorfismos vem sendo extensamente documentada. Dentre eles, o polimorfismo *Ava* II do gene do RLDL, localizado no exon 13 do gene do RLDL, envolve a substituição de uma Citosina (C) por uma Timina (T) na terceira base do códon 632 (valina), o que introduz um sítio de restrição (GGTTC → GGTCC) que é reconhecido pela enzima *Ava* II²⁰, têm sido associado com as variações do perfil lipídico, tanto em indivíduos hipercolesterolêmicos^{22, 24, 25}, quanto na população geral²⁰.

Recentemente no Brasil, Salazar e cols.²⁶ avaliaram as freqüências gênicas, genotípicas e o efeito dos polimorfismos *Hinc* II (exon 12) e *Ava* II (exon 13) do gene do

receptor da LDL (RLDL) sobre as concentrações séricas de lipídeos em 128 indivíduos caucasianos apresentando um perfil lipídico de alto risco para doenças cardiovasculares (GE) e em 100 indivíduos controles (GC). Os resultados mostraram que as freqüências dos genótipos A+A+ (*Ava* II) e H+H+ (*Hinc* II) foram maiores nos indivíduos do grupo GE. Nesse mesmo grupo, os genótipos A+A+, H+H+ e a interação A+A+/H+H+ foram associados a concentrações séricas mais altas de colesterol total e LDL-C. Esses dados indicam que os indivíduos portadores dos genótipos A+A+ e H+H+ do RLDL apresentam um perfil lipídico de maior risco para aterosclerose. O polimorfismo *Ava* II e *Hinc* II do gene do RLDL constitui-se, portanto, um marcador genético importante na avaliação da predisposição a essa enfermidade e, conseqüentemente, às doenças cardiovasculares.

Entretanto, a influência desses polimorfismos na resposta terapêutica em indivíduos hipercolesterolêmicos, precisa também ser avaliada. O arsenal terapêutico de hipocolesterolêmicos, antilipêmicos e reguladores de lipídeos é atualmente constituído de várias classes de fármacos. Dentre eles, os inibidores da 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) redutase, enzima que catalisa a etapa inicial da biossíntese do colesterol, bloqueando a biossíntese de mevalonato, constituem os agentes farmacológicos mais eficazes para o tratamento da hipercolesterolemia²⁷. Nesse grupo de inibidores, encontra-se a Fluvastatina que representa o primeiro composto hipocolesterolemiante totalmente sintético e ativo *per se*, sem metabólitos ativos circulantes, sendo uma das estatinas com o mais baixo índice custo/benefício. Seu planejamento e síntese foram obra dos pesquisadores do Instituto de Pesquisa da Sandoz. Este fármaco é extremadamente eficaz em reduzir as concentrações plasmáticas de LDL-C, inibindo a biossíntese do colesterol endógeno e estimulando o aumento da produção hepática de receptores para LDL. Embora sejam bem conhecidos os efeitos benéficos das estatinas sobre a hipercolesterolemia, pouco se sabe sobre a influência do polimorfismo genético sobre a

resposta terapêutica. No presente trabalho, pela primeira vez no Brasil, foi avaliado o efeito do polimorfismo *Ava II* do gene do receptor da LDL sobre a resposta ao tratamento com Fluvastatina em indivíduos com diagnóstico clínico e laboratorial de hipercolesterolemia.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Casuística

Grupo de estudo - De forma aleatória selecionou-se 55 pacientes hipercolesterolêmicos, classificados de acordo com os critérios do 2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias²⁸, constituído por 15 indivíduos de sexo masculino, com idade variando entre 37 e 68 anos e 40 indivíduos de sexo feminino, com idade entre 36 e 70 anos, tratados durante 16 semanas com uma dose diária de 40 mg (24 indivíduos) e 80 mg (31 indivíduos) do medicamento hipocolesteremiante Fluvastatina (LESCOL[®]) por via oral, provenientes de um estudo multicêntrico, coordenado pelo Prof. Tit. Éder C.R. Quintão da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. Os indivíduos apresentando *diabetes mellitus*, hipotireoidismo, ou tratamento com contraceptivo oral, foram excluídos do estudo.

Material biológico - Foram colhidas amostras de sangue de todos os indivíduos, após jejum de 10 a 12 horas, antes e após 16 semanas de tratamento, utilizando o sistema de coleta a vácuo, em tubos com e sem anticoagulante (EDTA 1 mg/ml sangue). As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas a 2500 rpm (1050 g) por 10 minutos em centrífuga Celm modelo LS 35 (Celm Ind., São Paulo, Brasil) para obter o soro a ser usado nas determinações bioquímicas. Dos tubos contendo sangue total, uma

alíquota de 1ml foi retirada e acondicionada em tubos de microcentrífuga de 1,5 ml para posterior extração do DNA das células sangüíneas.

2. Determinações bioquímicas

A concentração sérica de colesterol total foi determinada pelo método enzimático-colorimétrico²⁹. A concentração de colesterol da HDL foi determinada após a separação das demais lipoproteínas pelo uso de ácido fosfotúngstico e cloreto de magnésio³⁰. As concentrações do colesterol da LDL e VLDL foram obtidas através da fórmula de Friedewald³¹, quando o conteúdo de triglicerídeos foi menor a 4,78 mmol/L. As concentrações das apolipoproteínas B-100 e A-I foram determinadas pela técnica de Radioimunoensaio (RIA)³².

Para a adequada interpretação clínica dos valores de lipídeos séricos, foram utilizados os critérios do 2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias²⁸.

3. Controle de Qualidade

A monitorização da precisão, exatidão e controle de qualidade das determinações séricas de lipídeos, lipoproteínas e apolipoproteínas, foi realizada pela determinação concomitante de soros controle normal e patológico comerciais, de acordo com as recomendações de Tibúrcio (1995)³³.

4. Extração do DNA das células sangüíneas periféricas

O DNA genômico foi extraído a partir de sangue total pelo método de precipitação salina modificado no nosso laboratório³⁴. Brevemente, as amostras de sangue foram submetidas à lise celular com 1000 µl do tampão Tris-1 (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM pH 8,0) contendo Triton X-100 a 2,5%. Após centrifugação, os núcleos celulares foram lisados com 220 µl do tampão Tris-2 (Tris-HCl

10 mM pH 8,0, KCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, EDTA 2 mM pH 8,0, NaCl 0.4 M) contendo SDS a 1%. A seguir, as proteínas foram removidas por precipitação salina com 100 µl de NaCl 5M. O DNA presente no sobrenadante foi isolado e purificado por precipitação etanólica e finalmente, ressuspensionado em 100 µl do tampão TE (Tris-HCl 10 mM e 1mM EDTA, pH 8,0) e mantidos a - 4°C.

A integridade das amostras de DNA foi avaliada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A quantificação e análise da pureza das amostras de DNA extraídos foram realizadas por espectrofotometria em UV após diluição (1:100) das amostras em tampão TE³⁵.

5. Amplificação e análise do polimorfismo *Ava* II do gene do receptor da LDL

As amostras de DNA foram submetidas à amplificação da região *Ava* II do gene do receptor da LDL, pela técnica de PCR, utilizando os iniciadores descritos por Hobbs e cols. em 1992¹⁷ e o protocolo otimizado por Salazar em 1998²⁶. Brevemente, os produtos de PCR (228 bp) foram submetidos à restrição enzimática com 1,5 U da enzima *Ava* II por 6 horas à 37°C. Os produtos amplificados, bem como os digeridos com a enzima *Ava* II, foram analisados em gel de agarose 2% após serem corados com brometo de etídeo. Os resultados foram documentados com o sistema fotográfico Polaroid modelo DS34, filme 667 instantâneo, 3000 ASA.

O genótipo homozigoto A+A+ para o polimorfismo *Ava* II do gene do RLDL foi identificado pela presença de dois fragmentos, um de 141 bp e outro de 87 bp. Enquanto que no genótipo homozigoto A-A- observou-se apenas um fragmento de 228 bp. O heterozigoto A-A+ foi caracterizado pela presença das três bandas: 228 bp, 141 bp e 87 bp.

6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados através do programa SigmaStat para Windows, versão 1,0. Inicialmente todas as variáveis foram analisadas descritivamente. Para as variáveis contínuas, a análise foi feita através da observação dos valores mínimos e máximos, cálculo de médias e desvios padrões. Os valores que apresentaram distribuição anormal foram submetidos à transformação logarítmica para posterior análise por testes paramétricos³⁶. Para as variáveis classificatórias calculou-se freqüências absolutas e relativas.

A associação entre as variáveis mensuradas e os fatores de interesse foi verificada utilizando-se a Análise de Variância com múltiplos fatores³⁶. As comparações múltiplas foram analisadas pelo teste de Tukey³⁶. A comparação entre proporções foi avaliada através do teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher³⁶. O nível de significância considerado para os testes foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações séricas de lipídios e lipoproteínas, em particular a hipercolesterolemia, tem sido implicadas no desenvolvimento rápido e progressivo da aterosclerose e constituem um importante fator de risco para as doenças cardiovasculares (DCV)¹⁻⁵. A diminuição dos níveis de colesterol plasmático pode ser obtida por tratamento com drogas hipocolesterolemiantes, entretanto há diferentes graus de resposta que dependem das características individuais.

A tentativa de elucidar que genes estão potencialmente envolvidos com as variações lipídicas no plasma e com predisposição às DCV tem sido motivo de vários

estudos clínicos e epidemiológicos^{6, 23, 26}. A análise de polimorfismos de apolipoproteínas, receptores e enzimas envolvidas no metabolismo lipídico, especialmente o receptor da LDL, tem sido indicada como ferramenta indispensável nessas investigações.

Os polimorfismos do gene do receptor da LDL têm sido indicados como marcadores genéticos da hipercolesterolemia, devido à sua provável associação com mutações funcionais e com alterações da expressão gênica do RLDL^{20, 21}. O desenvolvimento de métodos simples para a genotipagem associados aos testes de triagem de mutações podem contribuir para o esclarecimento de quais fatores inerentes estão correlacionados ao desenvolvimento da doença cardiovascular, cujas manifestações podem ser reduzidas pelo uso de terapia mais adequada.

Vários estudos têm mostrado associação entre as variações nas concentrações de lipídeos e polimorfismos do gene RLDL^{6, 7, 13, 19-26}. Entretanto, nenhum estudo até o presente avaliou a associação entre polimorfismos do gene do RLDL e a resposta terapêutica à Fluvastatina. Portanto, esta é a primeira descrição do efeito do polimorfismo Ava II do gene do RLDL sobre a resposta ao tratamento com esse hipocolesteremiante sintético.

Na Tabela I podemos observar as concentrações de lipídeos, lipoproteínas e apolipoproteínas, antes e após 16 semanas de tratamento, de acordo com a dose diária de Fluvastatina recebida, 40 mg ou 80 mg, respectivamente.

Ao avaliar a resposta terapêutica à Fluvastatina nos indivíduos estudados após 16 semanas de tratamento, pôde ser observada uma acentuada redução dos parâmetros lipídicos analisados. Embora, o tratamento com esse hipolipemiante tenha produzido uma significativa redução dos lipídeos séricos, principalmente de CT, LDL-C, VLDL-C e apoB-100, as diferenças dos valores médios de lipídios, entre as duas dosagens não foram

significativas (Tabela I). Esses resultados permitem deduzir que o efeito do medicamento sobre o perfil lipídico foi independente da dose diária recebida.

A redução média nas concentrações séricas de colesterol total, LDL-C, VLDL-C e apolipoproteína B-100 nos indivíduos estudados foi de -22,5%, -29,7%, -10,9% e -21,3%, respectivamente. Esses dados são similares aos encontrados em pacientes hipercolesterolêmicos tratados com Fluvastatina de outras populações²⁷. Foi também observado um aumento aproximado de 2% nas concentrações de HDL-C e apoA-I nos indivíduos estudados.

TABELA I. Valores dos lipídeos séricos (Média \pm DP) antes e após 16 semanas de tratamento com Fluvastatina de acordo com a dose diária recebida

Parâmetros	40 mg (24)			80 mg (31)			P *
	antes	após	diferença	antes	após	diferença	
CT, mmol/L	7,34 \pm 0,72	5,43 \pm 0,52	-1,91 \pm 0,62	7,58 \pm 1,24	6,00 \pm 1,06	-1,57 \pm 0,87	0,09
HDL-C, mmol/L	1,27 \pm 0,41	1,31 \pm 0,65	0,01 \pm 0,18	1,14 \pm 0,21	1,16 \pm 0,21	0,03 \pm 0,15	0,64
LDL-C, mmol/L	5,00 \pm 0,75	3,23 \pm 0,57	-1,76 \pm 0,78	5,64 \pm 1,09	4,11 \pm 0,96	-1,51 \pm 0,98	0,31
VLDL-C, mmol/L	0,96 \pm 0,34	0,87 \pm 0,36	-0,10 \pm 0,32	0,85 \pm 0,41	0,74 \pm 0,36	-0,10 \pm 0,21	0,74
apo B-100, g/L	1,74 \pm 0,32	1,30 \pm 0,33	-0,42 \pm 0,40	1,71 \pm 0,40	1,31 \pm 0,31	-0,40 \pm 0,44	0,86

apo A-I, g/L	1,31 ± 0,34	1,38 ± 0,33	0,03 ± 0,47	1,23 ± 0,29	1,18 ± 0,22	-0,09 ± 0,44	0,41
--------------	-------------	-------------	-------------	-------------	-------------	--------------	------

*Teste "t" de Student (foram comparadas apenas as diferenças entre as duas doses)

Número de indivíduos em parênteses

Para converter os valores de mmol/L a mg/dL multiplicar por 38,7²⁸

CT: colesterol total, HDL-C: colesterol da HDL, LDL-C: colesterol da LDL, VLDL-C, colesterol da VLDL; apo B-100: apolipoproteína B-100 e apo A-I: apolipoproteína A-I.

A distribuição de genótipos e a freqüência dos alelos para o polimorfismo *Ava II* do gene do *RLDL* nos indivíduos estudados é apresentada na Tabela II. A freqüência de genótipos observada nos indivíduos brasileiros hipercolesterolêmicos estudados foram similares às esperadas em condições de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Adicionalmente, as freqüências de alelos foram similares às encontradas previamente pelo nosso grupo²⁶ e por outros autores em indivíduos hipercolesterolêmicos^{20, 24, 25}.

TABELA II. Distribuição de genótipos e freqüência de alelos para o polimorfismo *Ava II* do gene do *RLDL* em indivíduos Brasileiros hipercolesterolêmicos

Polimorfismo	Genótipos			Alelos	
	A+A+	A+A-	A-A-	A+	A-
<i>Ava II</i> (55)	31%	55%	14%	0.582	0.418

+/- indica a presença/ausência do sítio de restrição

Número de indivíduos em parênteses

Equilíbrio de Hardy-Weinberg: $\chi^2 = 0,804$ (1g.l., $p=NS$)

O efeito dos genótipos para o polimorfismo *Ava II* sobre os diferentes parâmetros lipídicos, antes e após 16 semanas de tratamento hipocolesteremiante, é apresentado na Fig. 1. Indivíduos portadores do genótipo A+A+ apresentaram valores de colesterol total, LDL-C, VLDL-C e apoB-100 ($p=0,0001$) mais altos quando comparado com os outros genótipos. Dados similares foram obtidos em um estudo recente²⁶ que avaliou a influencia desse polimorfismo sobre as concentrações de lipídios em indivíduos brasileiros apresentando alto risco para as doenças cardiovasculares. O genótipo A+A+ foi associado nesses indivíduos a concentrações mais altas de CT e LDL-C, quando comparado com os outros genótipos.

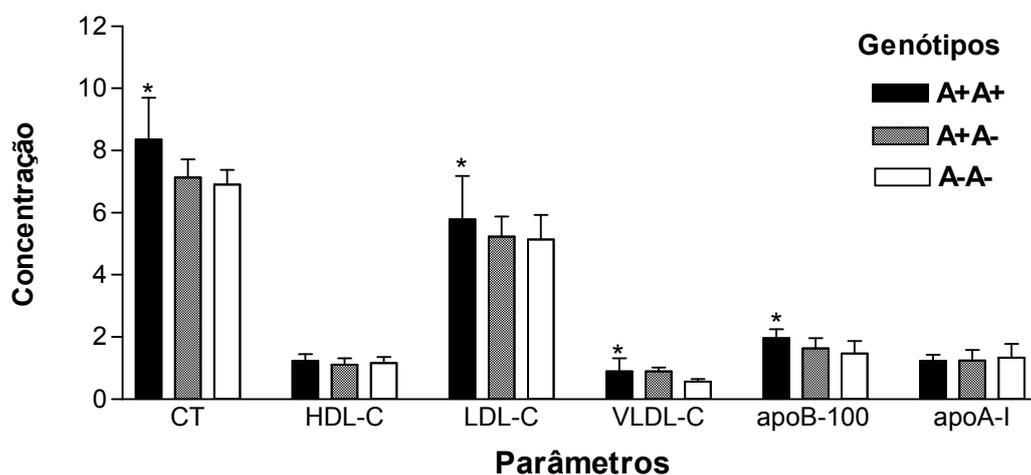
A influência dos diferentes genótipos do polimorfismo *Ava II* do gene do RLDL sobre a resposta terapêutica à Fluvastatina, é apresentada na Tabela III. Diferenças estatisticamente significativas foram observadas para a redução dos valores de CT, LDL-C e apo-B. Indivíduos com o genótipo A-A- apresentaram valores de redução desses parâmetros superiores aos dos indivíduos portadores dos genótipos A+A+ e A+A- ($P < 0,05$). Esses dados sugerem que a determinação do genótipo pode ser importante na avaliação da resposta individual a tratamentos para redução dos níveis séricos de colesterol.

Com o objetivo de obter uma melhor resposta terapêutica à Fluvastina nos indivíduos hipercolesterolêmicos portadores dos genótipo A+A+ e A+A-, as doses terapêuticas poderiam ser melhor ajustadas no tratamento desses indivíduos. Portanto, o polimorfismo *Ava II* do gene do receptor da LDL poderia contribuir na adequação da dose nesses indivíduos.

O mecanismo pelo qual o polimorfismo *Ava II* influencia as concentrações séricas de colesterol não está bem elucidado. Este polimorfismo pode estar ligado em desequilíbrio a outras alterações no gene do RLDL ou em locos gênicos adjacentes,

que tem efeitos diretos sobre os valores de lipídeos circulantes. Possivelmente, essas variações genéticas são segregadas na população estudada, juntamente com uma mutação funcional que predispõe os indivíduos a desenvolverem alterações lipídicas e, conseqüentemente, aumentam o risco para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares²⁰. Portanto, futuros estudos serão necessários para determinar a associação entre os polimorfismos e outras alterações genéticas presentes no gene do RLDL.

Em conclusão, os resultados obtidos indicam que o polimorfismo *Ava II* do RLDL contribui para a variabilidade dos lipídeos séricos no grupo estudado, constituindo-se um marcador genético útil, tanto na avaliação precoce de risco para as doenças cardiovasculares como no seguimento da terapia hipocolesteremiante.



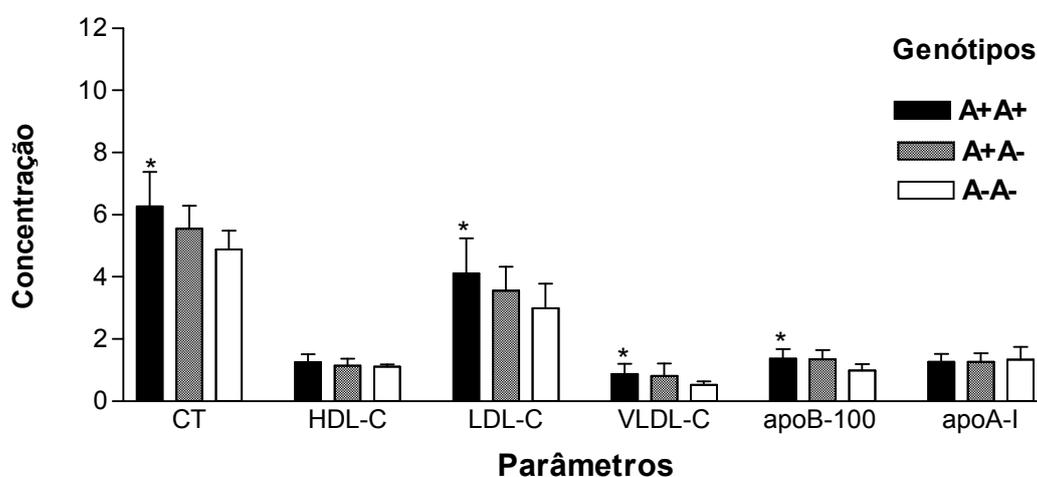


Figura 1. Valores de lipídeos séricos (Média \pm DP) dos indivíduos hipercolesterolêmicos, antes (*superior*) e após 16 semanas de tratamento com Fluvastatina (*inferior*), agrupados de acordo com os genótipos para o polimorfismo *Ava II* do gene do receptor da LDL. *Teste de ANOVA ($P < 0,05$).

Os valores de CT, HDL-C, LDL-C e VLDL-C estão expressos em mmol/L e as concentrações de apoB-100 e apoA-I em g/L. Para converter os valores de mmol/L a mg/dL multiplicar por 38,7²⁸

CT, colesterol total; HDL-C, colesterol da HDL; LDL-C, colesterol da LDL; VLDL-C, colesterol da VLDL; apoB-100, apolipoproteína B-100 e apoA-I, apolipoproteína A-I.

Tabela III. Valores de redução dos lipídeos séricos (Média \pm DP) nos indivíduos hipercolesterolêmicos de acordo com os diferentes genótipos para o polimorfismo Ava II do gene do RLDL, após 16 semanas de tratamento com Fluvastatina

Parâmetros	Diferenças			P*
	A+A+ (17)	A+A- (30)	A-A- (8)	
CT, mmol/L	-1,95 \pm 0,88	-1,58 \pm 0,74	-2,67 \pm 0,38	0,020
HDL-C, mmol/L	0,01 \pm 0,15	0,04 \pm 0,17	0,04 \pm 0,14	0,850
LDL-C, mmol/L	-1,89 \pm 0,75	-1,42 \pm 0,68	-2,57 \pm 0,46	0,007
VLDL-C, mmol/L	-0,10 \pm 0,24	-0,10 \pm 0,28	-0,14 \pm 0,23	0,700
apo B-100, g/L	-0,38 \pm 0,39	-0,25 \pm 0,27	-0,71 \pm 0,41	0,044
apo A-I, g/L	0,04 \pm 0,31	-0,08 \pm 0,38	0,07 \pm 0,90	0,912

Parâmetros	A+A+ vs A+A-	A+A+ vs A-A-	A+A- vs A-A-
CT	NS	P < 0,05**	P < 0,05
LDL-C	NS	P < 0,05	P < 0,05
apo B-100	NS	P < 0,05	P < 0,05

*Teste de ANOVA

**Teste de Tukey-Kramer

Número de indivíduos em parênteses

Para converter os valores de mmol/L a mg/dL multiplicar por 38,7²⁸

CT: colesterol total, HDL-C: colesterol da HDL, LDL-C: colesterol da LDL, VLDL-C: colesterol da VLDL, apo AI: apolipoproteína AI e apo B: apolipoproteína B

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a excelente assistência técnica da Farmacêutica Bioquímica Selma Andréa Cavalli; o auxílio profissional da estaticista Creusa Maria Roveri Dal Bó, e o fornecimento dos iniciadores utilizados nesse estudo pela Dra. Nga Y. Nguyen do CBER-FDA (Bethesda, EUA). Agradecemos também o auxílio financeiro do CNPq, CAPES e FAPESP. L. A. Salazar é Bolsista de Doutorado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Castelli WP.** Epidemiology of Coronary Heart Disease: The Framingham Study. *Am J Med.* 1984; 76:4-12.
2. **Anderson KM, Castelli WP, Levy D.** Cholesterol and Mortality 30 years of follow-up from the Framingham Study. *JAMA. J Am Med Assoc.* 1987; 257:2176-2180.
3. **Kannel WB.** Range of Serum Cholesterol Values in the population developing coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1995; 76:69C-77C.
4. **Stamler J, Wentworth D, Neaton JD.** Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded?. Findings in 356.222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA. J Am Med Assoc.* 1986; 256:2823-2828.
5. **Forti N, Fukushima J, Giannini SD.** Perfil lipídico de indivíduos submetidos à cinecoronariografia em diferentes regiões do Brasil. *Arq Bras Cardiol.* 1997; 68: 333-342.
6. **Gylling H, Kontula K, Koivisto UM, Miettinen HE, Miettinen TA.** Polymorphisms of the genes encoding apoproteins A-I, B, C-III and E and LDL receptor, and cholesterol and LDL metabolism during increase cholesterol intake . Common alleles of the apoprotein E gene show the greatest regulatory impact. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:38-44.
7. **Galton DJ.** Genetic determinants of atherosclerosis-related dyslipidemias and their clinical implications. *Clin Chim Acta* 1997; 257:181-197.
8. **Suzuki K, Kuriyama M, Saito T, Ichinose A.** Plasma lipoprotein (a) levels and expression of the apolipoprotein (a) gene are dependent on the nucleotide polymorphism in its 5' - flanking region. *J Clin Investv.* 1997; 99:1361-1366.
9. **Bercedo-Sanz A.** Impact of ApoE4 allele on total cholesterol levels of children in northern Spain. *Clin Genet.* 1999; 55:69-70.
10. **Ostos MA, Lopez-Miranda J, Ordovas JM, Marin C, Blanco A, Castro P, Lopez-Segura F, Jimenez-Perez J, Perez-Jimenez F.** Dietary fat clearance is modulated by genetic variation in apolipoprotein A-IV gene locus. *J Lipid Res.* 1998; 39:2493-2500.

11. **Friedlander Y, Berry EM, Eisenberg S, Stein Y, Leitersdorf E.** Plasma lipids and lipoproteins response to a dietary challenge: analysis of four candidate genes. *Clin Genet.* 1995; 47:1-12.
12. **Demant T, Houlston RS, Caslake MJ, Series JJ, Shepherd J, Packard CJ, Humphries SE.** The catabolic rate of low density lipoprotein is influenced by variation in the apolipoprotein B gene. *J Clin Invest.* 1988; 82:797-802.
13. **Bertolini S, Coviello D, Masturzo P, Zuccheto E, Elicio N, Balestreri R, Orecchini G, Calandra S, Humphries S.** RFLPs of the LDL-Receptor gene: their use in the diagnosis of FH and evaluation of different levels of gene expression on normal subjects. *Eur J Epidemiol.* 1992; 8:18-25.
14. **Brown MS, Goldstein JL.** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232:34-47.
15. **Pereira E, Ferreira R, Hermelin B, Thomas G, Bernard CH, Bertrand V, Hadad N, Mendez D, Bereziat G, Benlian P.** Recurrent and novel LDL receptor gene mutations causing heterozygous familial hypercholesterolemia in La Habana. *Hum Genet.* 1995; 96:319-322.
16. **Hobbs H, Leitersdorf E, Goldstein J, Brown M, Russell D.** Multiple crm- mutations in familial hypercholesterolemia. evidence for 13 alleles, including four deletions. *J Clin Invest.* 1988; 81:909-917.
17. **Hobbs H, Brown M, Goldstein J.** Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Hum Mutat.* 1992; 1:445-466.
18. **Levy E, Minnich A, Cacan, SL, Thibault L, Giroux LM, Davignon J, Lambert M.** Association of an Exon 3 mutation (Trp66-Gly) of the LDL receptor with variable expression of familial hypercholesterolemia in a French Canadian family. *Biochem Mol Med.* 1997; 60:59-69.
19. **Humphries SE, Coviello DA, Masturzo P, Balestreri jr, Orecchini G, Bertolini S.** Variation in the low density lipoprotein receptor gene is associated with differences in plasma low density lipoprotein cholesterol levels in young and old normal individuals from Italy. *Arterioscler Thromb.* 1991; 11:509-516.
20. **Ahn YI, Kamboh IM, Aston CE, Ferrell RE, Hamman RF.** Role of common genetic polymorphisms in the LDL receptor gene in affecting plasma cholesterol levels in the general population. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1994; 14:663-670.
21. **Gudnason V, Zhou T, Thormar K, Baehring S, Cooper J, Miller G, Humphries SE, Shuster H.** Detection of the low density lipoprotein receptor gene Pvu II intron 15 polymorphism using the polymerase chain reaction: association with plasma lipid traits in healthy men and women. *Disease Markers.* 1998; 13:209-220.
22. **Wiseman SA, Powell JT, Humphries SE, Press M.** The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low density lipoprotein receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77:108-112.
23. **Humphries SE, King-Underwood L, Gudnason V, Seed M, Delattre S, Clavey V, Fruchart J-CH.** Six DNA polymorphisms in the low density lipoprotein receptor gene: their genetic relationship and an example of their use for identifying affected relatives of patients with familial hypercholesterolemia. *J Med Genet.* 1993; 30:273-279.

24. **Miserez AR, Schuster H, Chidetti N, Keller U.** Polymorphic haplotypes and recombination rates at the LDL receptor gene locus in subjects with and without familial hypercholesterolemia who are from different populations. *Am J Hum Genet.* 1993; 52:808-826.
25. **Chaves FJ, Puig O, Garcia-Sogo M, Real J, Gil JV, Ascaso J, Carmena R, Armegod ME.** Seven DNA polymorphism in the LDL receptor gene: application to the study of familial hypercholesterolemia in Spain. *Clin Genet.* 1996; 50:28-35.
26. **Salazar L.** Polimorfismo *Ava II* e *Hinc II* do gene do receptor da LDL em indivíduos com perfil lipídico de alto risco para as doenças cardiovasculares. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Farmácia, Área de Análises Clínicas, Faculdade de Cs. Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
27. **de França FF, Korolkovas A.** Fluvastatina, novo inibidor da HMG-CoA redutase. *Rev Bras Med.* 1995; 52:898-912.
28. **Consenso brasileiro sobre dislipidemias: avaliação, detecção e tratamento.** [2º Consenso Brasileiro sobre Dislipidemias, São Roque, 1996]. *Arq. Bras. Cardiol.* 1996; 67:109-128.
29. **Fossati P, Medicci R.** Abstract Book. International Symposium on Cholesterol Control and Cardiovascular Diseases: Prevention and Therapy. Milan, Italy, 1987. Apud: Bayer Corporation, Diagnostic Division, Tarrytown, NY, Cholesterol-Fast color.
30. **Burstein M, Scholnick HR, Morfin R.** Rapid method for the isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanions. *J Lipid Res.* 1970; 11:583-595.
31. **Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS.** Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem.* 1972; 18:499-502.
32. **Rifai N, Bachorik PS, Albers JJ.** Lipids, lipoproteins, and apolipoproteins. In: Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Burtis CA, Ashwood ER. Eds. 3ed. 1999; 853-855.
33. **Tibúrcio HM.** Controle Interno da Qualidade Analítica. 1ª ed. Editora da Soc. Bras. Anál. Clín., Rio de Janeiro, RJ, 1995.
34. **Salazar LA, Hirata MH, Cavalli SA, Machado MO, Hirata RDC.** Optimized procedure for DNA isolation from fresh and cryopreserved clotted human blood useful in clinical molecular testing. *Clin Chem.* 1998; 44: 1748-1750.
35. **Sambrook J, Fritsch ER, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual.** 2.ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; E10-E14.
36. **Rosner B.** Fundamentals of biostatistics. 2.ed. Boston: PWS, 1986.

PROPOSTA DE UM MÉTODO ALTERNATIVO PARA A DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA.

PROPOSAL OF AN ALTERNATIVE METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE CONCENTRATION OF HEMOGLOBIN.

Fonteles, Z. M.; Lima, A. B. Queiroz, M.G.R. & Melo, C. L.*

**Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas - DACT
Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas - LACT
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem - FFOE
Universidade Federal do Ceará - UFC
FAX: (085)2439292- e-mail:clime@zipmail.com.br**

*** Prof. Assistente do Depto de Análises Clínicas e Toxicológicas/FFOE/UFC.**

RESUMO

A hemoglobina (Hb), principal componente das células vermelhas sanguíneas, é um conjugado de proteínas que serve como transporte de O₂ e CO₂, sendo assim, indispensável à manutenção da vida dos mamíferos. A quantidade de hemoglobina por 100 mL de sangue pode ser utilizada como índice da capacidade de transporte de oxigênio. O teor total de hemoglobina no sangue depende principalmente do número de eritrócitos e, em menor grau, da quantidade de hemoglobina existente em cada eritrócito. Dependendo do método utilizado e dos cuidados com os quais o laboratório afere seus instrumentos, os métodos para a determinação da hemoglobina que utilizam o espectrofotômetro e contadores automáticos, apresentam uma precisão de 4 a 5% e 2 a 3% respectivamente. Como alguns métodos para dosagem da hemoglobina baseiam-se na medida do índice de hemólise, introduzimos no presente trabalho uma técnica na qual foi utilizada apenas água deionizada como diluente, que, seguramente também provoca tal fenômeno. O método proposto tem como objetivo investigar a compatibilidade entre os resultados obtidos com os que fazem uso do ferricianeto de potássio e hidróxido de amônia. A concentração da hemoglobina foi determinada em 30 amostras de sangue recentemente colhidas com EDTA em tubo a vácuo. Para efeito comparativo, foram utilizados dois tipos de padrão: o que acompanha o kit e uma amostra de sangue devidamente padronizada pelo laboratório (LACT). Os resultados obtidos demonstraram diferenças significativas entre os métodos realizados com o padrão do fabricante, enquanto que, com o padrão de referência do laboratório, foi verificada uma significativa compatibilidade. Portanto, os dados indicam que o método proposto poderá ser útil na determinação da concentração da hemoglobina no laboratório clínico, não esquecendo o fato de que, além de outras vantagens, a toxicidade causada pelo ferricianeto é totalmente eliminada.

Palavras chave: hemoglobina, ferricianeto, hidróxido de amônia e água.

SUMMARY

The hemoglobin (Hb), main component of the sanguine red cells, is a conjugated of proteins that it serves as transport of O₂ and CO₂, being like this, indispensable to the maintenance of the life of the mammals. The amount of hemoglobin for 100 mL of blood can be used as index of the capacity of transport of oxygen. The total text of hemoglobin in the blood depends mainly on the erythrocyte number and, in smaller degree, of the amount of existent hemoglobin in each erythrocyte. Depending on the used method and of the cares with the ones which the laboratory its affaire instruments, the methods for the determination of the hemoglobin that your they use the spectrophotometer and automatic accountants, present a precision of 4 at 5% and 2 to 3% respectively. As some methods for dosage of the hemoglobin base on the measure of the hemolysis index, we introduced in the present work a technique in which was just used water deionized as diluent, that, it surely also provokes such phenomenon. The proposed method has as objective to investigate the compatibility among the results obtained with the ones that they make use of the potassium ferricyanide and ammonia hydroxide. The concentration of the hemoglobin was determined recently in 30 samples of blood picked with EDTA in tube to vacuous. For comparative effect, two pattern types were used: what accompanies the kit and a sample of blood properly standardized by the laboratory (LACT). The obtained results demonstrated significant differences among the methods accomplished with the maker's pattern, while, with the pattern of reference of the laboratory, a significant compatibility was verified. Therefore, the data indicate that the proposed method can be useful in the determination of the concentration of the hemoglobin in the clinical laboratory, not forgetting the fact that the toxicity caused by the ferricyanide is totally eliminated.

Key words: hemoglobin, ferricyanide, ammonia hydroxide and water.

1. INTRODUÇÃO

A hemoglobina (Hb) é um pigmento respiratório que, no homem e em outros vertebrados, se encontra localizado nos glóbulos vermelhos. É uma proteína conjugada pertencente ao grupo das hemoproteínas formada de globina, ferro e heme (protoporfirina)(Fig 1).

O complexo ferroso da protoporfirina deriva, como as demais, do composto denominado porfirina. A protoporfirina da hemoglobina é do tipo IX em que os grupos 1, 3, 5 e 8 foram substituídos por grupamentos metila, os grupos 2 e 4 por vinila e os grupos 6 e 7 por cadeias laterais de restos de ácido propiônico (1).

A síntese da hemoglobina é uma função muito importante do eritroblasto em maturação. Sendo o heme o grupo prostético, o suprimento das células com íons ferro é uma condição *sine qua non* para a formação da hemoglobina.(2).

Todas as hemoglobinas apresentam na sua formação, 4 cadeias peptídicas, idênticas duas a duas. Cada uma delas contém um grupamento heme capaz de ligar uma molécula de O₂. As diferenças entre as hemoglobinas fisiológicas consistem em cadeias peptídicas diversas. No homem existem 3 tipos hemoglobinas: Hb A₁ (adulto), Hb A₂ e Hb F (fetal) (2).

A formação da hemoglobina (heme) no organismo se faz pela síntese do anel de protoporfirina por conta da glicina e do ácido acético conforme demonstrado nas experiências de Shemin e Rittenberg com o nitrogênio pesado. A destruição da hemoglobina se realiza com digestão da globina, deixando livre o ferro proveniente do heme. O anel tetrapirrólico é então aberto na ligação α -metênica dando lugar à formação da série de pigmentos biliares (biliverdina, bilirrubina, etc), de acordo com os ensaios de Lemberg e Legge (1).

A globina representa a maior porção da molécula da hemoglobina. Sua síntese ocorre nos ribossomos dos eritroblastos, segundo um código genético pré-determinado, a partir de aminoácidos fornecidos ao organismo através dos alimentos. Sua formação é regulada por quatro diferentes gens capazes de proceder a síntese das quatro cadeias polipeptídicas que formam as globinas normais no indivíduo adulto (3).

Existe uma sincronização da síntese da globina com a das porfirinas e assim, quando há defeitos na síntese das globinas (talassemias), a síntese das porfirinas é reduzida de modo correspondente. Da mesma forma, quando existe uma deficiência na síntese das porfirinas não há excesso de produção de globinas. Entretanto, o mesmo não é verificado no que concerne ao ferro. Este é fornecido ao eritroblasto possivelmente pela siderofilina plasmática e pelos macrófagos da medula óssea repletos de ferro. No interior do eritroblasto o ferro é processado para síntese do heme. No entanto, se a síntese de globinas é deficiente, o ferro se deposita nos eritroblastos formando agregados de ferritina (4).

Vários métodos são utilizados em laboratórios clínicos na determinação da hemoglobina, os quais diferem no diluente hemolítico usado. O princípio das técnicas baseia-se na lise das hemácias com soluções hipotônicas e transformação da hemoglobina em oxihemoglobina ou cianometahemoglobina, as quais têm sido adaptadas universalmente para procedimentos manuais e automatizados (5).

O método da oxihemoglobina não é mais amplamente utilizado, mas ainda é um método satisfatório na determinação da hemoglobina. A grande desvantagem é a falta de uma solução padrão estável de HbO₂. Devido a simplicidade do método, pode ser

usado para comparar níveis de hemoglobina quando a quantidade absoluta não é necessária como na determinação da fragilidade osmótica ou da HbA₂. Este método não quantifica a carboxihemoglobina (HbCO), metahemoglobina (Hi) ou sulfohemoglobina (SHb), todas inativas no transporte de oxigênio.

O método da cianometahemoglobina (HiCN), recomendado pelo Comitê Internacional de Padronização em Hematologia (ICSH, 1978) tem a vantagem da conveniência, facilidade técnica e uma solução padrão estável e facilmente disponível no comércio.

O sangue é diluído numa solução de ferricianeto de potássio e cianeto de potássio. O ferricianeto de potássio oxida as hemoglobinas em metahemoglobina (Hi) e o cianeto de potássio fornece íons cianeto (CN⁻) para formar cianometahemoglobina (HiCN), que tem absorção máxima em 540 nm.

O uso do padrão (HiCN) para calibração do aparelho elimina uma grande fonte de erros e fornece comparabilidade entre todos os laboratórios que o empregam. A faixa de absorção ampla de HiCN na região de 540 nm torna-a conveniente para uso, tanto em fotômetros de filtro como em espectrofotômetros de faixa estreita. Com exceção da SHb, todas as outras variedades de hemoglobina são convertidas em HiCN (6).

Considerando que os referidos métodos fundamentam-se na medida do índice de hemólise e sabendo-se que a dissociação da hemoglobina também se faz em presença de água (1), alguns ensaios foram realizados com este diluente no sentido de investigar a compatibilidade dos resultados obtidos com as metodologias acima descritas.

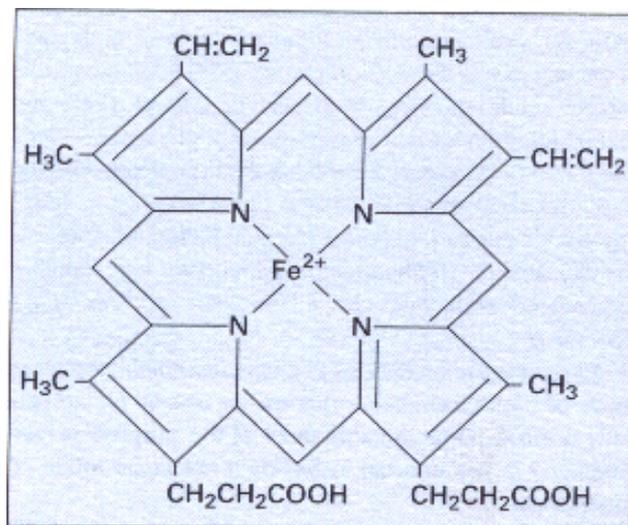


Figura 1: Estrutura do Heme

2. MATERIAL E MÉTODOS

Material biológico: Amostras de sangue recentemente colhidas com EDTA, em tubo a vácuo, de pacientes (masculino e feminino) atendidos no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas - LACT, foram utilizadas na determinação da concentração de hemoglobina em g/dL.

Diluentes:

- a) Ferricianeto de Potássio - Drabkin (Labtest) (6)
- b) Hidróxido de Amônia 0,04% - Albritton modificado (Reagen) (5)
- c) Água deionizada

Padrões utilizados:

- a) HiCN (Labtest – 10 g/dL)
- b) Amostra de sangue padronizada (LACT – 13,0 g/dL)

Técnica de padronização da amostra de sangue:

Em várias amostras de sangue recentemente colhido com EDTA, foram determinadas as concentrações de hemoglobina pelo método de referência (Drabkin). Os testes foram realizados em triplicata e a amostra que apresentou resultado igual a 13,0 g/dL foi escolhida e considerada como padrão de referência nas técnicas com hidróxido de amônia e água. É importante reafirmar que, a determinação da hemoglobina pelo método do ferricianeto para a obtenção do resultado padronizado, deve ser feita em triplicata e com extremo rigor técnico. Os tubos deverão ser armazenados em geladeira (2 a 8°C) e lidas as absorvâncias no sentido de checar o equipamento e verificar a compatibilidade entre as leituras diariamente até o momento em que houver necessidade de uma nova padronização. Concentrações diferentes da amostra padronizada neste trabalho também poderão ser utilizadas para o cálculo do fator de calibração.

Teste de estabilidade do método proposto: Leitura das absorvâncias à temperatura ambiente em 540 nm, após 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos e 24 horas.

Equipamento: Espectrofotômetro Micronal B 382

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta as concentrações de hemoglobina obtidas através dos métodos em estudo ($K_3Fe(CN)_6$, NH_4OH , e H_2O), utilizando como padrão HiCN do fabricante, na qual podemos observar uma grande incompatibilidade entre os resultados obtidos. A figura 2 confirma a discrepância existente entre estes resultados. Esta situação já era esperada, pois é bem conhecido que a técnica na qual utiliza-se o ferricianeto de potássio como diluente mede todas as variedades de hemoglobina, exceto sulfohemoglobina, enquanto que a metodologia realizada com hidróxido de amônia determina somente a oxihemoglobina.

A água por sua vez, segundo Haurowitz (1), também dissocia a hemoglobina formando oxihemoglobina de acordo com a reação abaixo:



Com base neste achado, decidimos investigar a confiabilidade dos resultados usando a água como diluente. A tabela 2 e a figura 3 demonstram claramente que há uma melhor correlação dos resultados entre ferricianeto de potássio (método de referência) e água do que entre ferricianeto de potássio e hidróxido de amônia quando da utilização da amostra de referência devidamente padronizada pelo laboratório.

Como já foi descrito anteriormente, não existe um padrão de HbO_2 com estabilidade confiável. Portanto, a adoção do método sugerido neste trabalho elimina este problema pelo fato do laboratório ter, no momento que lhe convier, uma amostra de sangue recentemente coletada e imediatamente processada e analisada.

Sabendo-se que a estabilidade da HiCN e HbO_2 é reconhecidamente comprovada através dos métodos empregados ($K_3Fe(CN)_6$ e NH_4OH), foram feitas leituras espectrofotométricas à temperatura ambiente em 540 nm após 5, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos e com 24 horas, com a finalidade de investigar a estabilidade do método alternativo. Nenhuma mudança significativa foi observada nas absorvâncias durante os tempos acima referidos (Fig. 4).

Com relação ao método proposto tendo como diluente apenas a água deionizada, podemos observar que, além da precisão (reprodutibilidade), são oferecidas outras vantagens, tais como: custo extremamente baixo, estabilidade do produto formado, facilidade na obtenção do diluente, a rotina do laboratório não é prejudicada pela falta de reagentes nas empresas fornecedoras e principalmente ausência de toxicidade. Ressalte-se que, este método alternativo beneficiaria laboratórios de pequeno porte e do interior do estado.

Paciente	K ₃ Fe(CN) ₆	NH ₄ OH	H ₂ O	Paciente	K ₃ Fe(CN) ₆	NH ₄ OH	H ₂ O
1	13,3	16,5	18,0	16	14,8	16,9	17,6
2	12,9	15,1	17,3	17	12,8	14,5	16,3
3	13,0	14,8	16,3	18	13,8	15,8	17,1
4	11,8	15,0	15,9	19	13,2	14,7	15,6
5	10,7	13,9	14,9	20	14,5	16,3	17,9
6	12,8	15,5	17,4	21	11,8	14,1	16,3
7	13,0	15,2	18,1	22	13,2	15,2	17,5
8	15,3	19,1	20,7	23	14,8	16,8	20,1
9	15,6	19,1	19,8	24	12,9	15,1	18,0
10	12,5	15,6	17,7	25	13,5	17,2	19,9
11	14,0	16,9	17,6	26	12,8	14,6	16,9
12	14,3	16,6	17,9	27	13,8	16,0	17,3
13	12,6	15,0	16,6	28	13,5	16,5	18,0
14	13,9	16,9	17,4	29	14,1	15,9	17,1
15	12,8	14,7	16,6	30	14,5	16,2	17,3

Tabela 1: Concentrações de hemoglobina (g/dL) determinadas através dos métodos: ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆), hidróxido de amônia (NH₄OH) e H₂O. Padrão utilizado: HiCN (Labtest).

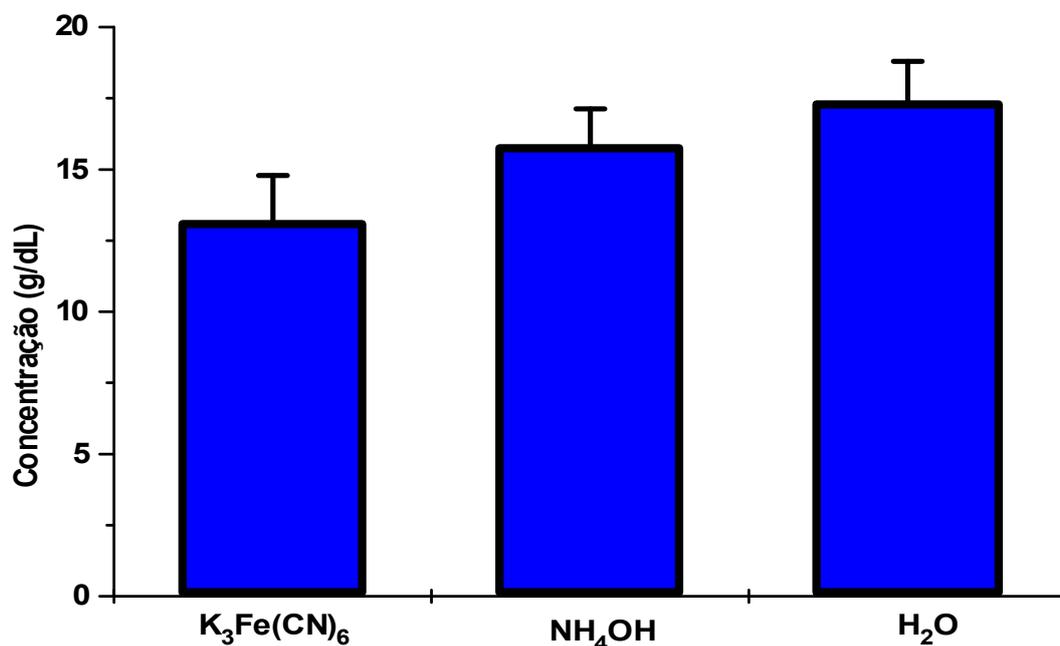


Figura 2. As barras representam a média ± E.P.M das concentrações (g/dL) de hemoglobina determinadas através dos métodos ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆), hidróxido de amônia (NH₄OH) e H₂O. Padrão utilizado: HiCN (Labtest).

Paciente e	K ₃ Fe(CN) ₆	NH ₄ OH	H ₂ O	Paciente	K ₃ Fe(CN) ₆	NH ₄ OH	H ₂ O
1	12,5	12,3	12,4	16	12,1	11,8	12,3
2	15,9	15,6	15,8	17	10,6	10,2	10,8
3	11,8	11,6	12,0	18	8,3	7,9	8,7
4	11,2	11,0	11,4	19	9,8	9,5	9,6
5	12,2	11,8	11,8	20	11,6	11,1	11,4
6	11,5	11,1	11,4	21	12,2	11,7	11,9
7	10,5	10,1	10,5	22	12,2	11,7	12,3
8	11,2	10,6	10,8	23	13,2	13,0	13,4
9	11,8	11,2	11,4	24	10,8	10,5	11,2
10	11,5	11,3	11,8	25	11,8	11,1	11,6
11	12,5	12,1	12,4	26	12,2	12,0	12,6
12	12,6	12,4	12,2	27	12,5	12,3	12,2
13	13,5	13,3	13,7	28	13,5	13,2	13,1
14	15,5	14,9	15,2	29	12,9	12,3	12,6
15	14,2	13,9	14,0	30	13,5	13,1	13,8

Tabela 2: Concentrações de hemoglobina (g/dL) determinadas através dos métodos: ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆), hidróxido de amônia (NH₄OH) e H₂O. Padrão utilizado: amostra padronizada no laboratório.

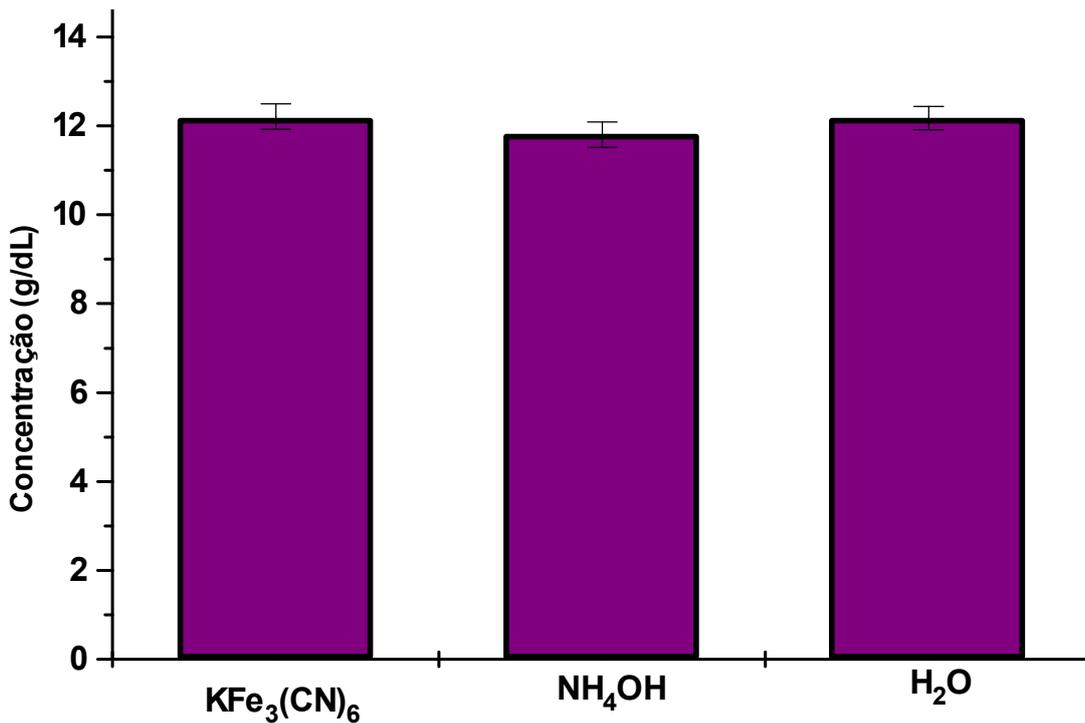


Figura 3. As barras representam a média \pm E.P.M das concentrações (g/dL) de hemoglobina determinadas através dos métodos ferricianeto de potássio (K₃Fe(CN)₆, hidróxido de amônia (NH₄OH) e H₂O. Padrão utilizado: amostra padronizada no laboratório.

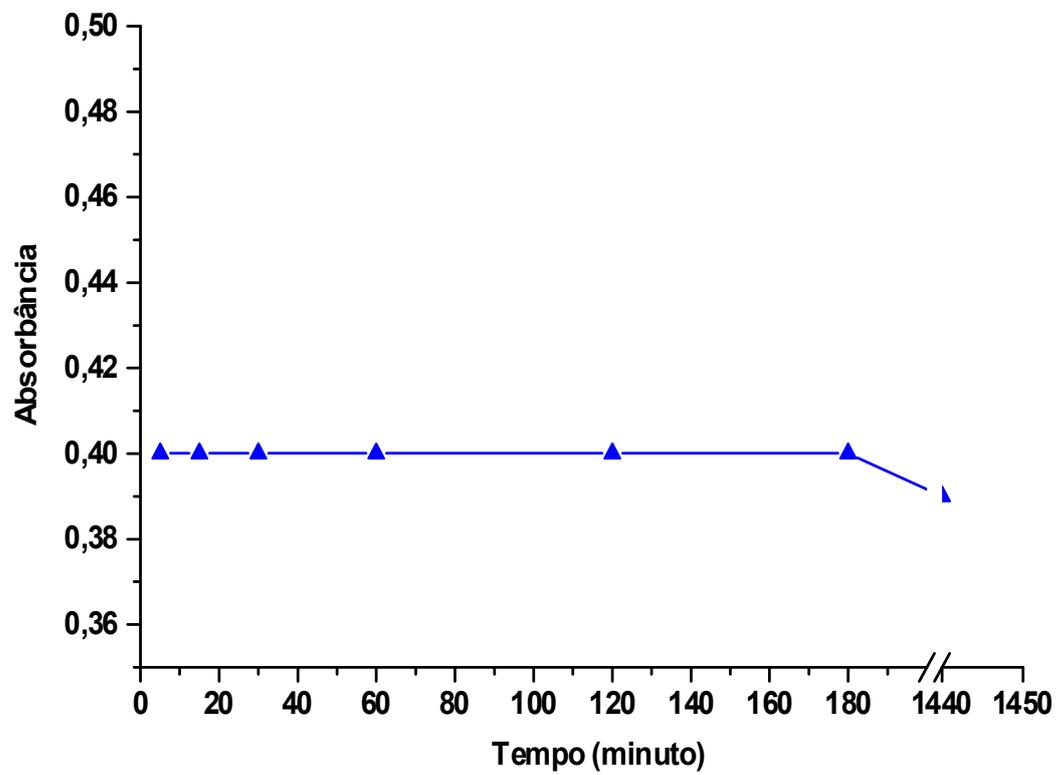


Figura 4. Teste de estabilidade do método proposto para a determinação da concentração de hemoglobina utilizando água deionizada como diluente. Os símbolos representam as leituras das absorbâncias em 540 nm.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Villela, G.G.;** Bioquímica do Sangue, 1ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1958.
2. **Karlson, P.; Gerok, W.; Gross, W.;** 1ª Edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan 1982.
3. **Carvalho, W.;** Técnicas Médicas de Hematologia e Imunohematologia, 4ª Edição, Minas Gerais: Editora de Cultura Médica, 1986.
4. **Lorenzi, T. F.;** Manual de Hematologia, 2ª Edição, Rio de Janeiro: Editora Médica Científica, 1992.
5. **Moura, R. A. A.;** Técnicas de Laboratório, 3ª Edição, Rio de Janeiro: Editora Atheneu, 1992.
6. **Henry, J. B.;** Diagnósticos Clínicos & Tratamento, 18ª Edição, São Paulo: Editora Manole, 1995.