

RBAC

Revista Brasileira de Análises Clínicas

SUMÁRIO

- Extração de DNA de coágulo sanguíneo humano como método alternativo para estudos de genotipagem** 151
Luis A. Salazar; Mario H. Hirata; Marcos O. Machado; Selma A. Cavalli; Elizabeth C.R. Guzmán; Nga Y. Nguyen & Rosario D.C. Hirata
DNA extraction from clotted human blood as an alternative method for genotyping studies
- Estudo e normatização da análise gasométrica no Hospital Universitário Regional de Maringá-HUM** 155
Luiz Roberto Bigão Giacomelli & Cláudio Arantes
Gasometrical analysis study and standardization at Hospital Universitário Regional de Maringá
- Importância da aplicação de anticorpos monoclonais no diagnóstico laboratorial das leucemias linfóides agudas** 159
Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior; Raquel Ciuvalschi Maia; Jane de Almeida Dobbin; Maria Kadma Carriço; Ransa Cabral Harab; Wilson Savino & Maria do Socorro Pombo de Oliveira
The importance to application of monoclonal antibodies in laboratorial diagnostic of lymphoblastic leukemia
- Ocorrência de *Cryptosporidium* sp em fezes diarreicas de crianças do Município de Maringá-PR** 168
Maria da Luz R. Moitinho; Andrea Cláudia B. S. Roberto & Maria do Rosário Martins
Occurrence of *Cryptosporidium* sp in diarrheic feces of children living in Maringá-PR
- Artigo de revisão**
Diabetes mellitus - uma revisão
Parte III: Tratamento, complicações agudas e crônicas do Diabetes mellitus 174
Ernesto P. de Oliveira; Luiz Gustavo P. Martins; Antenor Henrique P. Pedrazzi & Sérgio Akira Uyemura
Diabetes mellitus - a review
Part III: Treatment, acute and chronic complications of Diabetes mellitus
- Vírus da Hepatite G** 181
Hsiang Ju Lin
Hepatitis G virus
- Prevalência das enteroparasitoses nas vilas periféricas da grande Porto Alegre, nos assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos, no Estado do Rio Grande do Sul** 185
Geraldo A. De Carli; Marcia Mentz; Marilise B. Rott; Ana C.A. da Silva; Aline Wendorff; Tiana Tasca; Daniela S. Castilhos; Luciane Hypolito; Luciana Mylius; Rosana Montenegro & Germano De Carli
Survey of Intestinal parasites among school students inhabitants of Porto Alegre Metropolitan area and among rural communities of Rio Grande do Sul State
- Investigação de auto anticorpos em doenças da tireóide - Correlação entre os métodos de imunofluorescência indireta, aglutinação passiva e IRMA** 190
S.R.R. Utiyama; C. Boguszewski; V. Aleixo; R. Nisihara; F.C.S. Afonso; S.A.L. Chab; V. Camargo; F. Shibata & H. Graff
Investigation of autoantibodies in thyroid diseases- Correlation among indirect immunofluorescence, passive agglutination and IRMA
- Ocorrência de parasitoses intestinais em crianças da creche "Lar Menino Jesus", Natal-RN** 195
Maria dos Prazeres O. Nunes; Júlia Fernandes de L. Nunes; Edna Marques de A. Silva & Maria da Salete G. Costa
Occurrence of Intestinal parasitosis in children at the "Lar Menino Jesus" nursery school, Natal-RN

3

Estudo e normatização da análise gasométrica no Hospital Universitário Regional de Maringá-HUM*

Gasometrical analysis study and standardization at Hospital Universitário Regional de Maringá.

Luiz Roberto Bigão Giacomelli¹ & Cláudio Arantes²

RESUMO - Dos exames laboratoriais que subsidiam o clínico perante as situações de emergência, a análise gasométrica (gasometria) se pronuncia como um dos testes mais importantes, sendo responsável, face aos dados que fornece, pela determinação diagnóstica e terapêutica naquelas condições que envolvem o desequilíbrio ácido-básico. Os autores, efetuando análise de 538 gasometrias, que ocorreram no HUM - Hospital Universitário Regional de Maringá, no período de janeiro/95 a maio/96, analisaram os elementos de interferência na realização do exame, desde a obtenção das amostras até a interpretação dos resultados, e também buscam avaliar a realização das dosagens gasométricas no laboratório do HUM, atendendo a uma necessidade interna de majorar a qualidade dos serviços oferecidos enquadrando este enfoque como uma iniciativa de normatização dos POPs (Procedimentos Operacionais Padrão) aliados a um Programa de Garantia da Qualidade.

PALAVRAS CHAVE - Gasometria; controle de qualidades laboratorial; distúrbios ácido-básicos.

SUMMARY - Gasometrical Analysis is considered one of the main test on emergency situations. Nowadays this test is realize on automation machines conferring it a special sensibility.

Despite this accurate sensibility, it has many factors that interfere on results. These factors are associate with methodologies tests and patients basic health conditions.

Authors studying 538 gasometrics analysis at HUM - Hospital Universitário Regional de Maringá, try to showing some aspects of interference on this laboratorial tests, and presents considerations about methodology searching for quality improvement.

KEYWORDS - Gasometry; laboratorial control quality; acid-basic disorders.

* Trabalho realizado no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário Regional de Maringá. Trabalho Vencedor do Prêmio PNCQ/XXIV CBAC, Fortaleza, CE, 1997.

1 - Farmacêutico Bioquímico - Laboratório de Análises Clínicas - HUM - Maringá.

2 - Acadêmico do Curso de Medicina - Universidade Estadual de Maringá.

INTRODUÇÃO

A análise gasométrica ou gasometria, revela-se como um estudo primoroso do equilíbrio ácido básico cuja finalidade é auxiliar o clínico na elucidação diagnóstica de freqüentes distúrbios metabólicos e/ou respiratórios que ocorrem na rotina profissional.

Está claro que precisão e exatidão de um teste não são os únicos pontos a se considerar, e que uma boa anamnese, com um bom exame clínico, é que vão determinar a indicação apropriada para o exame, bem como quais os parâmetros a ser considerados relevantes e que determinarão o limiar de ação do clínico^{1,4}. Nos dias atuais a gasometria deixou de ser um exame titulométrico com complementação nomográfica e, em laboratórios especializados, há um gasômetro que possibilita análises de forma automatizada. Ainda assim, devem ser considerados fatores, tais como a metodologia e os elementos extrínsecos e intrínsecos da análise dos gases sanguíneos, que podem intervir com os resultados, mascarando-os ou mesmo alterando-os^{1,3,5}.

De modo geral, a maior parte da abordagem terapêutica a ser efetuada nos pacientes com quadros de alterações metabólico-respiratórias é determinado pela amplitude das anormalidades dos gases e do pH sanguíneo. Devido ao caráter múltiplo dos fatores envolvidos na determinação dos resultados da gasometria é natural e compreensível que este seja considerado como um exame complexo em sua análise. Todos os médicos devem buscar saber se os mecanismos determinantes de hipóxia arterial e/ou pH anormal são metabólicos, respiratórios ou mistos (o que acarreta várias complicações na interpretação) e se tais distúrbios estão ou não sendo compensados¹⁷.

Desta maneira cabe ao profissional médico, já durante a sua formação, familiarizar-se com as técnicas de punção arterial, de coleta adequada da amostra, conhecer o método empregado e também saber interpretar os resultados de uma gasometria.

Consideramos indispensável, portanto, que se conheça os pontos chave na realização do exame, os quais irão determinar sua acurácia e eficácia ou, se não observados, um resultado falseado e errôneo^{4,5,15}. Podemos agrupar os fatores que interferem na análise gasométrica em quatro grupos: 1- fatores que estão relacionados com o estado geral do paciente no momento da coleta, 2- fatores relacionados com a técnica da obtenção da amostra, 3- fatores relacionados com o método e 4- fatores relacionados com o estado clínico e patologias de base do paciente⁴.

Com relação ao estado geral do paciente no momento da coleta sabe-se que a coleta de sangue em recém-natos, crianças muito chorosas ou pacientes agitados, em particular, se houver dificuldade de acesso vascular causam variações significativas na PCO_2 . O estresse adicional causado por repetidas punções malsucedidas, aumento ou diminuição da atividade física (aqui incluindo convulsões e a anestesia geral respectivamente) e alterações na taxa metabólica em função de elevação ou diminuição da temperatura corpórea acarretam variações bruscas no quociente respiratório¹⁶.

Em observação à técnica de coleta cumpre salientar que é necessário utilizar material de boa qualidade (ainda que sejam específicos para este exame somente), efetuar boa heparinização da agulha ou escalpe e da seringa, técnica asséptica, evitar garroteamento dos membros avaliando ainda a perfusão do mesmo se é significativa com relação ao restante do organismo. Aplicar tensão mínima ao deslizamento do êmbolo, manipular a seringa de modo cuidadoso, efetuando imediatamente a vedação evitando-se bolhas de ar juntamente ao sangue. Urge conservação imediata da amostra caso o sangue não vá ser analisado de imediato⁶.

Cabe ao laboratório efetuar a dosagem dos gases em aparelho constantemente revisado e com calibrações metódicas e constantes sendo uniforme a aplicação da metodologia.

Uma vez conhecidos estes fatores interferentes há, ainda, que se considerar durante a interpretação dos resultados, aqueles elementos provenientes da investigação clínica que ainda poderão ser determinantes de interferência. Terapêutica prévia com catecolaminas ou hormônios esteróides, hipo ou hiperparatireoidismo, desnutrição acentuada, alimentação hipercalórica além de alguns distúrbios endócrinos menos comuns são causas destas interferências. Há que se ressaltar a patologia de base, deflagradora do distúrbio ácido-básico, bem como o comportamento dinâmico no atendimento ao paciente que pode, ainda, gerar novas interferências nas análises a serem realizadas^{2,12,16}.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante o período de janeiro de 1995 a maio de 1996 foram analisadas 538 amostras de sangue direcionadas para dosagem gasométrica de 245 pacientes atendidos no Hospital Universitário Regional de Maringá-HUM e 69 pacientes de outros hospitais desta cidade, sendo que 224 análises foram efetuadas em caráter de repetição, com solicitação clínica. Estes pacientes foram atendidos pelo pronto atendimento, ambulatório e enfermarias hospitalares, sendo investigados e acompanhados, posteriormente, via prontuário médico.

Padronização Técnica

A coleta de sangue foi obtida por punção arterial ou venosa, conforme solicitação prescrita no pedido médico. Caso na solicitação constasse apenas "gasometria", padronizou-se a coleta do sangue arterial, sendo este material o mais recomendado, refletindo com maior fidedignidade a fisiologia ácido-base e as condições de oxigenação frente ao estudo dos gases sanguíneos⁶. Os locais utilizados para a punção foram as artérias radiais, braquiais e femurais, para a coleta de sangue arterial, sendo o sangue venoso obtido de locais conforme a facilidade de acesso para o profissional responsável.

Foram utilizadas seringas de vidro na maioria das coletas por não causarem alteração significativa na pressão dos gases, salvo casos em que a coleta torna-se um pouco mais difícil como ocorre com algumas crianças e recém-natos ou adultos agitados (pacientes que apresentam-se em "stress" devido a dificuldade de coleta), recomenda-se então, utilizar seringas de plástico pois nestes casos a coleta pode ser um pouco mais demorada e, a aspiração não sendo contínua, evita-se a constante formação de bolhas que é frequentemente observada com a utilização das seringas de vidro. É importante salientar que este material é reutilizado após esterilização, resultando assim, em queda na qualidade do mesmo, como perda de suas propriedades de encaixe (êmbolo-seringa), e este passa a adquirir certa porosidade interna após consequentes lavagens e reesterilizações.

Utilizou-se a heparina por ser considerada como o anticoagulante de escolha quando utilizada em quantidades adequadas (50 µl de heparina a 5.000 UI/ml para 5 ml de sangue). Outros anticoagulantes que poderiam ser utilizados; o EDTA, o citrato e o oxalato afetam significativamente o pH^{11,13}.

A técnica de coleta utilizada deve ser anaeróbica, devendo-se retirar as bolhas imediatamente após a coleta e vedar a agulha com rolha de borracha. Demais artigos porosos, como a cortiça, podem produzir contaminação do material biológico. Para a

coleta de sangue não se utilizou garrote, tanto para obter o sangue venoso como arterial, evitando-se assim alteração na pressão dos gases no local de punção^{11,13}.

Quando necessárias outras dosagens laboratoriais simultaneamente à gasometria procedeu-se a utilização do plasma após efetuada a análise gasométrica e, para os exames que dependiam de soro ou sangue total com outros anticoagulantes, efetuou-se outra coleta em separado.

Após a obtenção das amostras, estas foram encaminhadas imediatamente ao laboratório, procurando-se dosá-las em no máximo 10 minutos após a coleta. Quando impossibilitada a dosagem dentro deste prazo, as amostras poderiam permanecer até 30 minutos à temperatura ambiente e após este período seriam desprezadas. Não houve necessidade de conservarmos amostras sob refrigeração em nossas análises, porém a recomendação é de que estas permaneçam até 2 horas à temperatura de 4 a 8 °C se não for possível a dosagem prévia¹³.

Empregou-se para estas dosagens o analisador gasométrico da marca DRAKE, modelo AGS 21, adquirido pelo HUM em meados de 1994. Após a padronização operacional, em nosso laboratório, este gasômetro vem apresentando excelente performance técnica.

A confiabilidade do procedimento analítico, está ligada intrinsecamente à manutenção do aparelho, onde busca-se seguir uma normatização técnica a fim de garantir a qualidade da análise³.

O aparelho acima citado, possui sistema de calibração automática, calibrando (01 ponto) a cada hora, após lavagem prévia simplificada com substâncias de valor conhecido: pH=7.383, CO₂ a 5%, O₂ a 12% e N. A cada 2 horas é realizada outra calibração (02 pontos) onde os valores fornecidos são: pH=6.389, CO₂ 10% e N¹³. Este procedimento de calibração é solicitado como rotina e, manualmente pelo analista, minutos antes de cada dosagem gasométrica.

O processo de manutenção adequada, envolve uma prevenção diária (limpeza e verificação geral do aparelho); quinzenal (troca de membranas e da solução eletrolítica do eletrodo de referência); mensal (limpeza química e troca de anéis dos eletrodos); trimestral (troca de tubulações e limpeza do gabinete); semestral (troca de anéis, válvulas e lubrificação) e anual (ajuste da pressão barométrica).

Após a manutenção quinzenal ou quando houver dúvidas sobre algum erro analítico ligado a defeitos do aparelho, é realizada a dosagem de ampolas controle (ácido, normal e alcalino), sendo os valores de pH, pCO₂ e pO₂ previamente conhecidos e fornecidos pelo fabricante. Este procedimento é de grande importância para a verificação da acurácia do exame e para a manutenção da qualidade desta análise.

Foi realizado um estudo retrospectivo dos prontuários dos pacientes atendidos por este serviço, onde buscou-se analisar o procedimento metodológico empregado perante uma solicitação de dosagem gasométrica, dando ênfase aos pontos críticos que viriam a interferir em um resultado de alta qualidade, assim como, procurou-se otimizar a padronização da metodologia empregada.

RESULTADOS

Das 538 amostras de sangue coletadas para a análise gasométrica, 475 foram investigadas retrospectivamente via prontuário do paciente para a confirmação diagnóstica clínico-laboratorial.

Levando-se em consideração estritamente os parâmetros e alterações ocasionadas pelo desequilíbrio ácido-básico, observou-se a prevalência de resultados anormais $n=362$ (76.2%) em contraste aos resultados normais $n=113$ (23.8%).

Observou-se a prevalência de acidose em 289 dosagens (60.8%), sendo que, em 247 amostras o resultado foi indicativo de acidose metabólica, em 32 acidose respiratória e, em 10 indicou acidose indeterminada. Os resultados caracterizados como alcalose estiveram presentes em 63 dosagens (13.3%), com predomínio de alcalose respiratória em 49 amostras, alcalose metabólica ocorrendo em 03 e de etiologia indeterminada em 11. Encontrou-se 10 resultados (2.1%) que indicaram a presença de distúrbios mistos do metabolismo, conforme mostrado na Tabela A e Figura A.

Dos 245 pacientes investigados, 37 (15.1%) eram recém-natos (RN), Figura B. O estudo demonstrou que 16 (43.2%) destes pacientes passaram por novas análises (média de 3.5 repetições/RN). Dos 208 (84.9%) pacientes restantes, 71 (34.1%) passaram por novas análises com uma média significativamente menor (1.6 repetições/paciente), Figura C, sendo que houve uma única repetição em 71,8% destes últimos.

A análise revelou que 56% dos pacientes eram do sexo masculino e 44% do sexo feminino.

DISCUSSÃO

A análise gasométrica difere da maior parte dos exames laboratoriais devido ao seu caráter emergencial. É importante que a realização da mesma seja feita por equipe experiente e competente, desde a coleta do material até a liberação dos resultados, pois da rapidez e fidelidade deste exame dependem a terapia e o prognóstico do paciente, o que qualifica esta dosagem pela grande confiabilidade que deve possuir^{2,7}. Vários fatores pertinentes ao processo técnico da dosagem podem ser elementos marcantes, podendo acarretar perda na confiabilidade do teste.

Para que se possa obter resultados de alto padrão em um teste com tantos fatores de interferência, a busca da qualidade deve ser uma constante e cada etapa do processo necessita ser continuamente analisada. Ainda que restem vários fatores relacionados ao estado mórbido do paciente, que possam afetar a gasometria, é dever dos laboratoristas minorar o número de interferências buscando a condição ideal em que estas não ocorram¹⁰.

Quaisquer processos que acarretem estresse no paciente culminam com quedas ou elevações pontuais de maneira brusca no metabolismo, afetando o quociente respiratório, alterando a pressão parcial dos gases e sua difusão levando a uma alteração dos teores na circulação². A manipulação dos pacientes, em especial dos recém-natos, deve restringir-se ao mínimo necessário. A temperatura dos pacientes também deve ser considerada uma vez que reflete, de modo direto, em alterações na velocidade do metabolismo e, por conseguinte, maior ou menor produção de CO_2 , frequência respiratória alterada e modificações na PO_2 ^{2,8,16,17}. As interferências que alteram a pCO_2 , a pO_2 e o pH afetam diretamente o teor de bicarbonato uma vez que este parâmetro, no método automatizado, é resultado de cálculos obtidos com base nos valores dos itens anteriores^{2,6,13}.

Dos pacientes que realizaram gasometria no laboratório do HUM, a maioria deu entrada no hospital pelo Serviço de Pronto Atendimento (PA), em condições emergenciais, onde a avaliação clínica teve de ser efetuada de modo rápido e pouco se obteve da história dos pacientes. A pobreza de informações, nestes casos, pode ocultar fatores importantes na análise global do exame face às condições do paciente. A urgência, a pressão psicológica que caracterizam o atendimento, a coleta e a realização da

dosagem nestas situações podem determinar várias formas de erros que culminarão em atrasos nos resultados podendo terminar em consequências danosas ao paciente¹².

Em nosso serviço observamos que, em alguns casos, pode-se coletar o sangue em extremidades onde ocorre hipóxia relativa, alterando portanto, o resultado da dosagem. Pode ocorrer também coleta de sangue venoso enquanto se pretendia gasometria arterial. A coloração do sangue e a pressão retrógrada no êmbolo da seringa não são característicos de total confiabilidade para atestar uma coleta arterial, especialmente nos casos de hipóxia acentuada e hipovolemia. Punções malsucedidas e repetidas acarretam perda de anticoagulante e entrada de ar na seringa, formando bolhas, o que ocorre de modo especial ao se utilizar seringas de vidro mal ajustadas e efetuando a aspiração do sangue de modo rápido.

Nas amostras analisadas houve, relativamente à faixa etária, uma frequência bimodal de pacientes caracterizando um predomínio na utilização de gasometrias para recém-natos (15.1 %) e adultos (aproximadamente 80 %). As dosagens realizadas nos recém-natos apresentaram uma média de repetições (3.5 / criança) significativamente maior que para os adultos. Tal fato esteve relacionado com a aplicação de uma terapêutica mais delicada e prudente levando à solicitação de controles e também ao maior estresse que a coleta provoca nas crianças, prejudicado por um acesso vascular difícil, competição durante o atendimento, devido à atenção dada ao paciente por vários profissionais de saúde e manipulação excessiva^{9,17}.

As dosagens realizadas nos adultos apresentaram uma média baixa de controles (1.6 / adulto) e esteve associada ao fato da utilização de uma terapêutica que pretendia fazer uma correção de forma total e mais imediata já determinando resultados satisfatórios após um ou dois controles. Também foi caracterizado maior facilidade de coleta nestes pacientes.

Observou-se, nos resultados indicativos de distúrbios, um predomínio de acidose. A acidose metabólica foi responsável por 85,5 % destes resultados marcadamente devido a Diabetes Melitus descompensado. Nos exames indicativos de alcalose aquela do tipo respiratório foi majoritária com 77,8 % dos resultados, marcadamente devido a patologias da respiração.

O número de dosagens realizadas no período foi superior ao n total (538). Temos o registro de 44 análises efetuadas em duplicidade quando foi solicitada uma nova coleta, de imediato após a primeira, por suspeitar-se de sangue venoso ter sido coletado ao invés do sangue arterial. No início da padronização da metodologia não nos detivemos a este detalhe e algumas amostras em duplicidade foram perdidas por uma superposição de registros no gasômetro (aproximadamente 20 amostras). Temos por estimativa que cerca de 10 % das coletas, relativas ao n total, foram realizadas em duplicata para comprovação da amostra, evitando-se assim na obtenção de dados incorretos por analisar-se amostras inadequadas.

Para uma perfeita padronização técnica e, buscando a melhor interrelação dos profissionais envolvidos neste tipo de análise, foi realizado um curso de treinamento e aperfeiçoamento sobre o equilíbrio ácido-básico, coleta e dosagem gasométrica.

Os objetivos deste estudo e da normatização metodológica empregada, são dar um melhor embasamento teórico e prático aos profissionais envolvidos e traçar um caminho em prol da melhoria da qualidade e do aprimoramento técnico que determinem uma melhor utilização clínica dos resultados deste abrangente exame laboratorial.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos amigos, funcionários do laboratório de análises clínicas do HUM, pelo apoio técnico-científico oferecido durante o desenvolvimento deste trabalho.

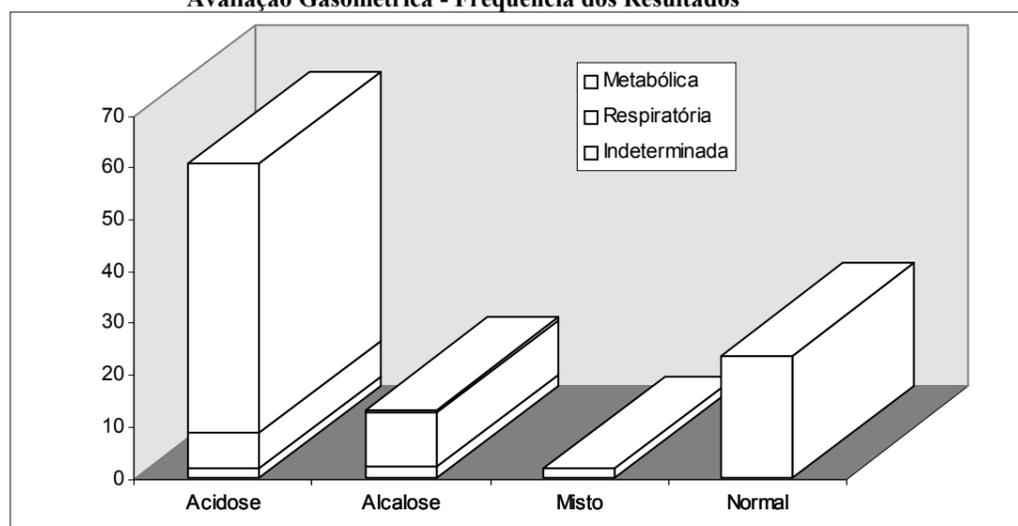
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **BERWICK, D. M.; GODFREY, A. B. & ROESSNER, J.** *Melhorando a qualidade dos serviços médicos, hospitalares e de saúde*. São Paulo, Makron Books do Brasil Editora Ltda, 1995.
2. **BOWE, E. A. & KLEIN JR, E. F.** Ácidos e bases, gases sanguíneos, eletrólitos. In Barash, P.G. *et al* editores. *Tratado de Anestesiologia Clínica*. 1. ed. Bras. São Paulo, Editora Manole Ltda, 1: 799 - 844, 1993.
3. **CARVALHO, C. S.** Diagnóstico por computadores. *Medicina Moderna*. 8: 79-82, 1984.
4. **CASTELO FILHO, A. & MARCOPITO, L. F.** A interpretação de testes diagnósticos. *Revista Ass. Med Brasil*. 30(3): 64-66, 1984.
5. **FARAJ, M.** Aspectos básicos da interpretação dos exames complementares. *JBM*. 6(2): 124-133, 1992.
6. **GAIDO JR, A. & RODRIGUES, F. M. P.** Gasometria. *LAES & HAES*. 10(9): 12, 1980.
7. **GOLDBERGER, E.** *Alterações do equilíbrio hídrico, eletrolítico e ácido-base*. 5. ed. São Paulo, Editora Guanabara Koogan, 1978. 404 p.
8. **GORINA, A. B.** *A clínica e o laboratório*. 12. ed. São Paulo, Editora Guanabara Koogan. 1984. p. 72-84.
9. **GROSS, J. L., ARAÚJO, A. & PECIS, M.** Cetoacidose diabética em crianças: Aspectos do metabolismo ácido-básico e do tratamento com infusão endovenosa de insulina., *Rev.Ass. Med. Brasil.*, 33(2, 3), 1987.
10. INMETRO (DINQP/DICRE). Princípios das boas práticas de laboratórios. *LAES & HAES*. 3: 88-102, 1995.
11. **LIMA, A.O, SOARES, J. B., GRECO, J. B., GALIZZI, J., CANÇADO, J. R.,** *Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica Técnica e Interpretação*, 7 ed., São Paulo, vol 1, cap. 2-2, 1992.
12. **LOPEZ, M. et al.** Tratamento intensivo do estado de choque. Determinantes clínicos do prognóstico. *Revista Ass. Med Brasil* . 27(8): 220-224, 1981.
13. Manual de Operação do Gasômetro DRAKE AGS 21, 1994.
14. **RUSSO E. M. K. & MOTA J. T.** O programa de qualidade total do laboratório Fleury. *LAES & HAES*. 3: 72-78, 1995.
15. **SACKET, D.L.** Uma "cartilha" sobre precisão e exatidão do exame clínico. *Ars Curandi*. 3(Suppl Jama 1): 523-532, 1993.
16. **SHIGUEMATSU, KENJI & SEGRE, C. A. M.** *Distúrbios respiratórios*. In Segre, C. A. M. & Armellini, P. A. RN. 2. ed. São Paulo, Editora Sarvier, 1985, p. 174 - 180.
17. **TRUNIGER, B.** *Equilíbrio hidroeletrólítico. Diagnóstico e Terapêutica*. 1. ed. São Paulo, EPU, 1977.
18. **WEINBERGER, S. E. & DRAZEN, J. M.** Distúrbios da função respiratória. In Wilson J. D. *et al* editores *Harrison Medicina Interna*. 12. ed. São Paulo, Editora Guanabara Koogan, 1992. 1 v., cap. 201.

TABELA A
Frequência dos resultados encontrados nas gasometrias

<i>Processo envolvido</i>	<i>Origem do distúrbio</i>	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
ACIDOSE	Metabólica	247	85.5	289	60.8
	Respiratória	32	11.0		
	Indeterminada	10	3.5		
ALCALOSE	Metabólica	03	4.7	63	13.3
	Respiratória	49	77.8		
	Indeterminada	11	17.5		
MISTO				10	2.1
NORMAL				113	23.8
TOTAL				475	100

FIGURA A
Avaliação Gasométrica - Frequência dos Resultados



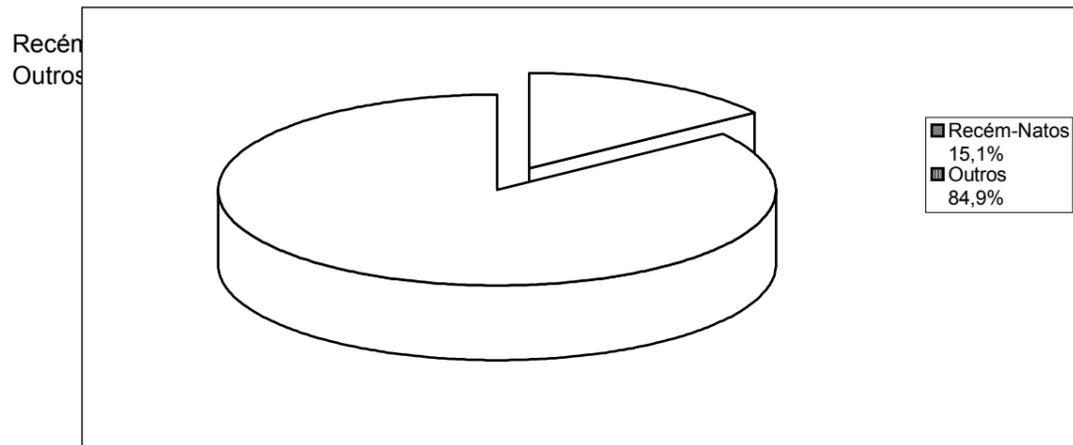
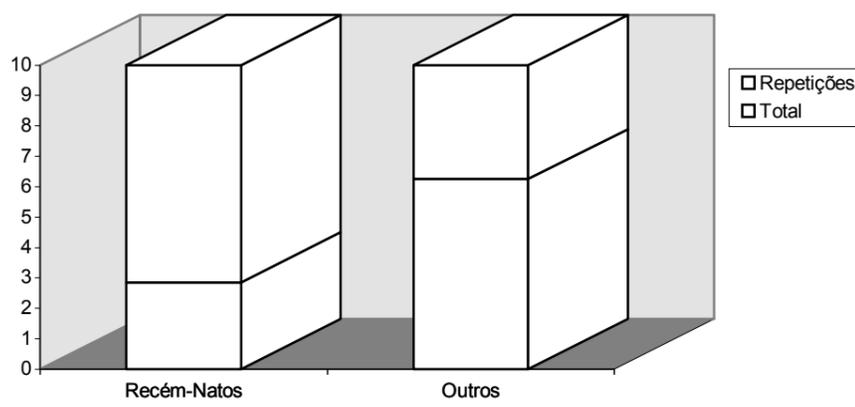


FIGURA B
Frequência de Recém-Natos

FIGURA C
Frequência das Repetições



Extração de DNA de coágulo sanguíneo humano como método alternativo para estudos de genotipagem *

DNA extraction from clotted human blood as an alternative method for genotyping studies

Luis A. Salazar¹, Mario H. Hirata¹, Marcos O. Machado, Selma A. Cavalli, Elizabeth C. R. Guzmán, Nga Y. Nguyen² & Rosario D. C. Hirata¹

RESUMO - Foi otimizado um método de extração de DNA de coágulo sanguíneo. Amostras de sangue total colhidas em EDTA e de coágulo foram obtidas de 10 indivíduos não aparentados. Os coágulos foram homogeneizados (sistema Potter-Elvejyn NSE-11 R). O DNA foi extraído pelo método de precipitação salina modificado (*Clin.Chem.42:S298,1996*). A quantificação e a pureza do DNA foram realizadas por espectrofotometria em 260 e 280 nm, sendo a sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose. A qualidade do DNA foi avaliada por amplificação da região polimórfica *Ava II* do gene do receptor da LDL, por PCR. A quantidade de DNA de coágulo foi semelhante a de sangue total ($61,5 \pm 11,9$ e $60,6 \pm 12,6$ mg/ml de sangue, respectivamente). A pureza do DNA de coágulo foi semelhante a de sangue total ($A_{260/280} = 1,87 \pm 0,19$ e $1,96 \pm 0,17$, respectivamente). As amostras de DNA apresentaram-se intactas no gel de agarose e sem contaminação com RNA. O rendimento do DNA obtido por este método foi maior que o dos descritos em outros estudos e mostrou-se adequado para análise do polimorfismo genético do receptor da LDL. Portanto, o procedimento de extração de DNA, otimizado em nosso laboratório, é simples, rápido e aplicável para obtenção de DNA de alta qualidade de amostras de coágulo sanguíneo, sendo útil em estudos de genotipagem.

PALAVRAS CHAVE - Extração de DNA, coágulo sanguíneo, gene do receptor da LDL, genotipagem

SUMMARY - We have optimized a method for processing many samples of blood clots for isolation of highquality DNA for genotyping studies. DNA was extracted from EDTA-anticoagulated blood and clot samples. The clots were homogenized using a Potter-Elvejyn NSE-11 R system. DNA from one ml of each sample was extracted by a modified salting-out procedure (*Clin.Chem. 42:S298,1996*). Quantification and purity of the DNA samples were determined by spectrophotometry at 260 and 280 nm. DNA integrity was verified by 1.0% agarose gel electrophoresis. In order to test the suitability, we have amplified the *Ava II* polymorphic region of the human low density lipoprotein (LDL) receptor gene. The amount of DNA recovered from fresh clot was similar to that obtained anticoagulated whole blood (61.5 ± 11.9 and 60.6 ± 12.6 μ g/ml of blood, respectively). The DNA purity of the fresh clot assessed by the $A_{260/280}$ ratio was comparable to the whole blood (clot vs. whole blood, 1.87 ± 0.19 vs. 1.96 ± 0.17). Gel electrophoresis data have shown that all DNA samples were intact and not present RNA contamination. In conclusion, DNA extraction procedure optimized in our laboratory is simple, fast and reliable for obtaining high quantities of high-quality DNA from clotted blood specimens for genotyping studies.

KEY WORDS - DNA extraction, blood clot, genotyping, LDL receptor gene.

INTRODUÇÃO

O potencial de aplicações das técnicas de DNA recombinante em laboratórios de Bioquímica Clínica estão se tornando altamente evidentes, especialmente no diagnóstico molecular das doenças hereditárias. Em estudos genéticos populacionais são utilizadas técnicas de identificação de polimorfismo através das diferenças de tamanho dos fragmentos de restrição (RFLP) que requerem métodos de extração de DNA rápidos e eficientes para processar grande número de amostras. Muitos dos métodos já desenvolvidos para esse fim consomem tempo^{5,12}, envolvem a digestão com proteinase K^{5,12,9}, incubações com RNase para remover o RNA², requerem um grande volume de sangue (10-15 ml), ou utilizam solventes

orgânicos como fenol, clorofórmio e álcool isoamílico^{6,11}, os quais são altamente tóxicos. Embora esses métodos recuperem o DNA de alto peso molecular de uma grande variedade de amostras, eles requerem muitos passos incluindo a transferência dos extratos de DNA para recipientes adicionais ou a utilização de procedimentos de purificação do DNA^{2,5}, que aumentam o risco de troca de amostras e da introdução de contaminantes. Considerando estes aspectos, essas técnicas mostram-se pouco apropriadas para uso na rotina dos laboratórios clínicos. A maioria dos testes de DNA para fins diagnósticos envolve a extração de DNA genômico dos leucócitos huma-

Recebido em 25.06.97

Aprovado em 14.07.97

* Vencedor do Prêmio SBAC do XXIV CBAC, Fortaleza, CE, 1997
Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, Brasil
Facility for Biotechnology Resources, CBER, FDA, Bethesda, EUA

nos, obtidos geralmente de sangue anticoagulado com EDTA ou ACD^{2, 3, 5, 6, 10, 11}. Entretanto, em alguns casos o volume de sangue obtido não é suficiente para todas as análises (por ex. Southern blot). Com o objetivo de avaliar o método alternativo para a extração de DNA genômico, a partir de coágulo sanguíneo, otimizamos técnica de "salting out"⁸ desenvolvida previamente em nosso laboratório (Clin. Chem. 42:S298, 1996), para obter DNA de alta qualidade para o uso em estudos de genotipagem. As amostras de DNA extraídas por este método foram submetidas a técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) para amplificar a região polimórfica Ava II, localizada no exon 13 do gene do receptor da lipoproteína de baixa densidade (LDL), a qual tem sido indicada como marcador genético da hipercolesterolemia^{1, 4, 7, 14}.

Materiais e Métodos

1. Amostragem

No presente trabalho foram estudados 10 indivíduos hipercolesterolêmicos (Colesterol total superior a 5,18 mmol/L), provenientes do Hospital Universitário da USP, São Paulo, SP. As amostras de sangue foram colhidas por venopunção antecubital, utilizando um sistema de coleta a vácuo. Foram coletados 5 ml de sangue em tubos contendo EDTA a 5% como anticoagulante. Da mesma forma, foram coletadas amostras de sangue em tubos sem anticoagulante para obtenção dos coágulos. Uma alíquota de 1 ml de sangue total foi separada e acondicionada em tubos de microcentrifuga de 1,5 ml para posterior extração do DNA. As amostras de sangue sem anticoagulante foram centrifugadas em centrífuga clínica Celm modelo LS 35 (Celm Ind., S. Paulo, Brasil) a 2500 rpm (1050 g), durante 10 minutos para a separação do soro a ser usado nas determinações bioquímicas. Os coágulos foram homogeneizados em solução de NaCl 0,9% usando o sistema Potter-Elvehjyn NSE-IIR, 1 ml deste homogeneizado foi transferido para um tubo de microcentrifuga para posterior extração do DNA.

2. Métodos

2.1. Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído pelo método de Lahiri & Nurnberger⁸ modificado em nosso laboratório (Clin. Chem. 42:S298, 1996). Brevemente, as amostras de sangue total e do homogeneizado de coágulo foram

submetidas à lise celular na presença do tampão Tris-HCl, pH 8,0 contendo sais e triton X-100. As proteínas foram removidas por precipitação salina e o DNA liberado do material nuclear foi isolado e purificado por precipitação etanólica. O DNA foi ressuspensionado em tampão TE (tris-HCl 10 mM e 1 mM EDTA, pH 8,0) e mantidos a -20°C .

2.2. Avaliação eletroforética e quantificação do DNA genômico

As amostras de DNA extraído foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE (Tris-HCl 0,45 mM, ácido bórico 0,45 mM e EDTA 2,5 mM). As bandas de DNA foram coradas com brometo de etídeo (0,5 µg/ml) e visualizadas sob luz U.V

A quantificação e análise da pureza dos extratos de DNA foram realizadas em espectrofotômetro Beckman modelo DU 7400 após diluição das amostras (1:100) em tampão TE¹².

2.3. Amplificação e análise da região polimórfica 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 e protocolo, descritos por Hobbs e cols. Em 1992⁷. Os produtos de PCR foram submetidos à restrição enzimática com 1,5 U da enzima Ava I I 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.

2.4. Análise estatística

Foram estimadas a média aritmética (média), o desvio padrão (DP) e o coeficiente de variação intraensaio (C.V.) para os resultados de quantificação do DNA obtidos. O teste "t" de Student, a análise de variância e a análise de regressão linear foram utilizadas para comparação dos resultados obtidos pelos 2 métodos.

RESULTADOS

A Tabela 1 apresenta as concentrações de DNA e as relações de absorvância em 260 e 280 nm (relação A_{260/280}) obtido das amostras de sangue total e de coágulo sanguíneo após análise espectrofotométrica. Como se pode observar, as amostras de DNA apresentaram elevada pureza, relação $A_{260/280} = 1,55$ a 2,09, sendo as concentrações semelhantes nos dois métodos.

Na Tabela 2 são mostrados os valores de coeficientes de variação (C.V.) intraensaio dos métodos utilizados para extração de DNA genômico das amostras de sangue total e de coágulo.

Na Figura 1 é apresentada a avaliação eletroforética em gel de agarose das amostras de DNA extraídos de sangue total e coágulo sanguíneo humano.

A Figura 2 mostra o gráfico de regressão linear das concentrações de DNA genômico extraídas de sangue total e coágulo sanguíneo.

Na Figura 3 são apresentados os produtos de amplificação (228 bp) por reação em cadeia da polimerase da região polimórfica Ava II do gene do receptor da LDL. As amostras de coágulo apresentaram a mesma eficiência de amplificação que as amostras de sangue total.

Na Figura 4 observamos a análise do polimorfismo Ava II do gene do receptor da LDL. O genótipo homozigoto A+A+ é identificado pela presença de dois fragmentos, um de 141 bp e outro de 87 bp (linha 3). Enquanto que no genótipo homozigoto A-A- observa-se apenas um fragmento de 228 bp (linha 5). O heterozigoto A-A+ é caracterizado pela presença das três bandas: 228 bp, 141 bp e 87 bp (linhas 2 e 4).

DISCUSSÃO

Uma das dificuldades da extração de DNA genômico pelos métodos correntes é o uso de solventes orgânicos, como fenol, clorofórmio ou álcool isoamílico^{6,12}, que são altamente tóxicos, exigindo procedimentos de segurança específicos. O método proposto neste trabalho evita o uso de solventes, sendo, portanto, mais adequado para uso na rotina laboratorial. As modificações desenvolvidas em nosso laboratório (Clin. Chem. 42:S298,1996) para extração de DNA de sangue total permitiram aumentar a precisão e a praticabilidade do método, sendo, dessa forma, aplicável também a amostras de coágulo. A substituição do Nonidet P40 por Triton X-100 na etapa inicial de lise, permitiu diminuir o custo e o número de lavagens necessárias para eliminar completamente a hemoglobina. Além disso, todo o processo pôde ser realizado à temperatura ambiente, sendo os resultados obtidos semelhantes ao procedimento a 4⁰C, tornando o método ainda mais prático para o uso na rotina do laboratório clínico.

A avaliação eletroforética do DNA extraído mostrou que o procedimento realizado eliminou completamente a contaminação com RNA (Figura 1). O DNA extraído de coágulo sanguíneo apresentou a mesma qualidade que o extraído de sangue total (Figura 1). A alta pureza do DNA extraído de amostras de coágulo pode ser verificada pela relação A₂₆₀/A₂₈₀, como podemos observar na Tabela 1. Essas características revelam que a extração de DNA genômico a partir de coágulo produz amostras de DNA de qualidade comparável a aquelas obtidas de sangue total e adequadas para fins de amplificação do genes (Figura 3).

O estudo comparativo entre concentrações de DNA obtido de sangue total e de coágulo mostrou excelente correlação (Figura 2, r =0,933) e a análise de

variância (teste f) e teste “t” demonstraram não diferença dos resultados obtidos pelos dos métodos. Os C.V. intraensaio apresentados na Tabela 2 são considerados aceitáveis na rotina laboratorial, segundo as normas dos programas de controle de quantidade¹³.

As amostras de DNA extraído a partir de coágulo mostraram-se adequadas para amplificação do gene do receptor da LDL e análise de restrição enzimática (Figuras 3 e 4). Os resultados obtidos possibilitam concluir que a extração de DNA de coágulo sanguíneo é uma boa alternativa para estudos genéticos que envolvam um grande número ou volume de amostras, sendo, portanto, aplicável a estudos de genotipagem.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a colaboração do Prof. Dr. Carlos A.C. Sannazzaro e da Farmacêutica-Bioquímica Francesca Cardilio Theobaldo, do Serviço de Laboratório Clínico do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Berkmann, N.; Weir, B.; Pressman-Schwartz, S.; Reshef, A. and Leitersdorf, E.** Haplotype analysis at the low density lipoprotein receptor locus: application to the study of familial hypercholesterolemia in Israel. *Hum Genet*, 88:405-410,1992.
2. **Garg, U.; Hanson, N.;Tsai, M. and Eckfeldt, J.** Simple and rapid method for extraction of DNA from fresh and cryopreserved clotted human blood. *Clin. Chem.* 42 (4):64647-648,1996.
3. **Everson, R.; Mass, M.and Gallager,J.**Extraction of DNA from cryopreserved clotted human blood. *BioTechniques*, 15 (1):18-20,1993.
4. **Fridlander, Y.; Berry, E.; Eisenberg, S.; Stein, Y. and Leitersdorf, E.** Plasma lipids and lipoproteins response to a dietary challenge: analysis of four candidate genes. *Clin. Genet.*, 47: 1-12,1995.
5. **Grimberg, J.; Nowoschik, S.; Belluscio, L.; McKee, R.; Turck, A. and Eisenberg, A.** A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* 17 (20): 8390, 1989.
6. **Gruber, A. and Zingales, B.** Single-Tube genomic DNA isolation from whole blood without pre-isolating white blood cells. *Bio Techniques*, 19 (1), 30-33, 1995.
7. **Hobbs, H.; Brown, M. and Goldstein, J.** Molecular Genetics of the LDL receptor gene in familial hypercholesterolemia. *Human Mutation* 1: 445-466, 1992.
8. **Lahiri, D. and Nurnberger, J.** A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res.* 19 (19): 5444, 1991.
9. **Miller, S.; Dykes, D. and Polesky, H.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16 (3): 1215,1988.
10. **Planelles, D.; Llopis, F.; Puig, N. and Montoro, J.** A new, fast, and simple DNA extraction method for HLA and VNTR Genotyping by PCR amplification. *J. Clin. Lab. Anal.* 10: 125-128, 1996.
11. **Sambrook,J.;Fristch,E.andManiatis,T.** *Commonly used techniques in molecular cloning. In Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NewYork, 1989.
12. **Tas,S.** Purification of DNA from clotted blood. *Clin. Chem.* 36 (10):1851, 1990.
13. **Tiburcio, H.M.** *Controle Interno da Qualidade Analítica.* 1^a ed. Editora da Soc. Bras. Anál. Clín., Rio de Janeiro, RJ, 1995.

14. **Wiseman, S.; Powell, J. and Humphries, S.** The magnitude of the hypercholesterolemia of hypothyroidism is associated with variation in the low density lipoprotein receptor gene. *J. Clin. Endocrinol Metab.*, 77(1): 108-112, 1993.

Endereço para correspondência:

Prof. Luis A. Salazar

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

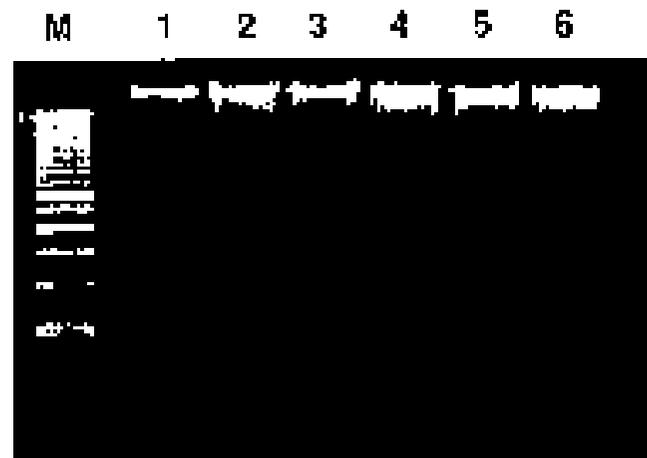


Figura 1. Eletroforese em gel de agarose a 1% de DNA extraído do coágulo sanguíneo (linhas 1-3) e de sangue total (linhas 4-6). Padrão de DNA de 100 bp (linha M)

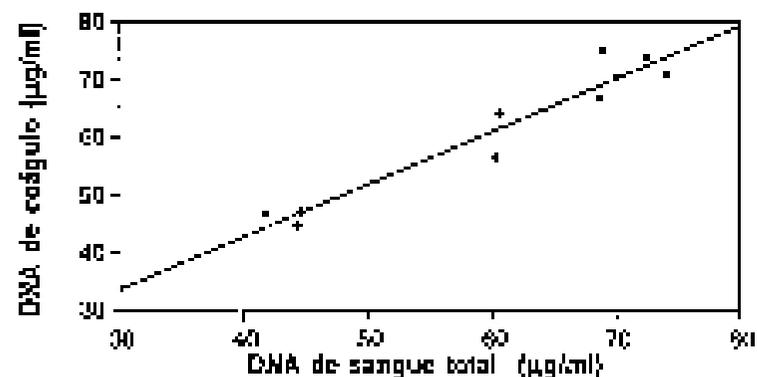


Figura 2. Gráfico de regressão linear dos valores de concentração do DNA genômico extraído de sangue total e de coágulo sanguíneo. Valor de $r = 0,933$.

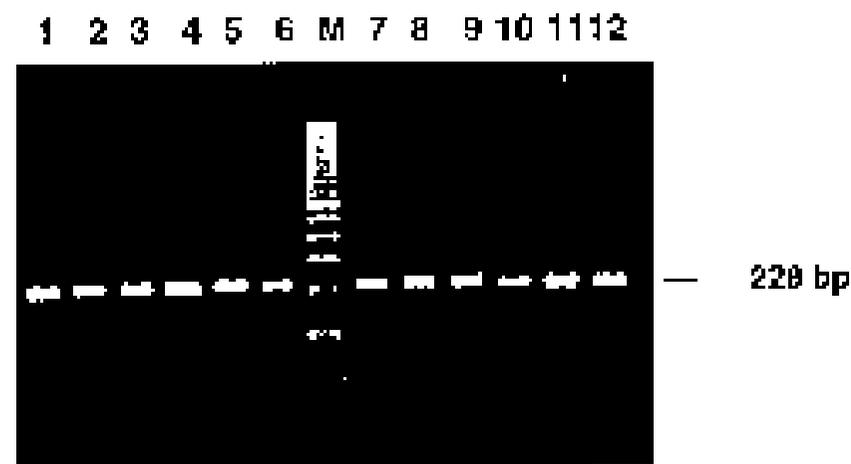


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose a 2% dos produtos da amplificação obtidos do DNA de sangue total (linhas 1-6) e do coágulo (linhas 7-12) da região polimórfica *AvaII* do gene do receptor de LDL. Padrão de DNA de 100 bp (linha M).

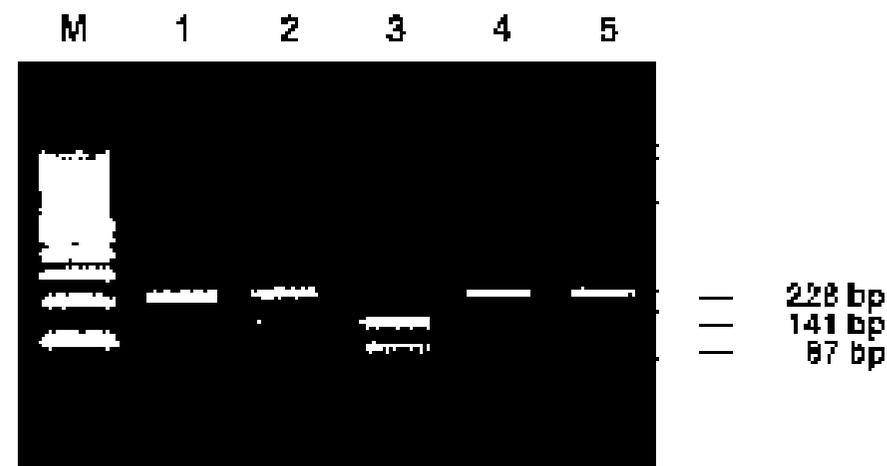


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose a 2% para análise dos fragmentos de restrição de polimerização *AvaII* do gene do receptor de LDL. Padrão de DNA de 100 bp (linha M); produto de amplificação (linha 1); genótipo A+A+ (linha 2); genótipo A-A- (linha 3); genótipo A-A+ (linhas 4 e 5).

TABELA 1
Concentração de DNA genômico e relação A₂₆₀/280
obtidas das amostras de sangue total e de coágulo
sangüíneo humano

Amostras DNA (10)	Relação A₂₆₀/280	Concentração de (ug/ml)
Coágulo sangüíneo		
Média ± DP	1,87 ± 0,19	61,5 ± 11,9
Faixa	1,55-2,08	44,6-74,8
Sangue total		
Média ± DP	1,96 ± 0,17	60,6 ± 12,6
Faixa	1,57-2,09	41,7-74,0

Número de amostras em parênteses

TABELA 2

Valores de média, DP e C.V. intraensaio dos métodos
Utilizados para extração de DNA genômico de sangue
total e de coágulo sangüíneo

Parâmetros	Sangue Total (ug/ml)	Coágulo sangüíneo (ug/ml)
Média	63,5	65,5
DP	18,3	28,9
C.V. intraensaio	2,9%	4,4%

*Em20 determinações

Importância da aplicação de Anticorpos Monoclonais no Diagnóstico Laboratorial das Leucemias Linfóides Agudas (*).

The Importance to Application of Monoclonal Antibodies in Laboratorial Diagnostic of Lymphoblastic Leukemia.

Geraldo Barroso Cavalcanti Júnior⁽¹⁾; *Raquel Ciivalschi Maia*⁽²⁾; *Jane de Almeida Dobbin*⁽²⁾; *Maria Kadma Carriço*⁽²⁾; *Ransa Cabral Harab*⁽³⁾; *Wilson Savino*⁽⁴⁾; *Maria do Socorro Pombo de Oliveira*⁽⁵⁾.

(*) Trabalho realizado no Laboratório de Marcadores Celulares do Centro de Transplante de Medula Óssea do Instituto Nacional de Câncer-RJ.

(1) Professor Assistente do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Ex-Estagiário de Pós Graduação (Mestrado) do Laboratório de Marcadores Celulares do Instituto Nacional de Câncer-RJ; (2) Médicas Hematologistas do Instituto Nacional de Câncer -RJ; (3) Pesquisadora do Instituto Nacional de Câncer; (4) Pesquisador Titular da Fundação Oswaldo Cruz-RJ; (5) Médica Pesquisadora do Instituto Nacional de Câncer -RJ

RESUMO:

Os autores realizaram um estudo em 126 pacientes portadores de leucemia linfóide aguda (LLA) antes de tratamento, com metodologias que incluiu a análise citomorfológica e imunofenotipagem com painel de anticorpos monoclonais (Ac.Mo.) específico para leucemias agudas como o CD1a, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD19, CD22, CD34, anti IgM, anti *kappa*, anti *lambda*, anti cadeia μ e anti TdT, através de técnicas como a imunoperoxidase e citometria de fluxo. Paralelamente também foi investigada informações referentes aos pacientes como a idade e sexo, assim como dados clínicos e laboratoriais dentre os quais a presença de massas tumorais, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, infiltração leucêmica no sistema nervoso central (SNC) e contagem de células blásticas no sangue periférico. Os resultados demonstraram que 71 casos (56,7%) foram de LLA de linhagem B (Null, Comum, pré-B e B) e 55 LLA de Células T (pré-T, T-intermediária e T-medular). Relacionando-se estes dados com o sexo, observou-se que o sexo masculino foi o mais acometido pela doença, independente da classificação imunológica. Correlacionando-se a idade com os subtipos imunológicos, observou-se que as LLAs de linhagem B foram mais frequentes em crianças (idade < que 15 anos) ao passo que as LLAs de Células T estiveram mais presentes em indivíduos adultos. A frequência da relação destas imunofenotipagens com os subtipos morfológicos da classificação FAB apresentaram uma correlação direta entre o subgrupo L3 e LLA de células B, ao passo que os subgrupos L1 e L2 correlacionaram-se mais frequentemente com as LLA pré-B e T respectivamente. A análise da correlação entre a imunofenotipagem e o perfil clínico patológico destas LLA demonstraram que as LLA de Células T estavam mais associadas com formas tumorais da doença com uma maior incidência de linfadenopatias, hepatomegalias, esplenomegalias, massas tumorais e infiltração no SNC, apresentando também uma maior contagem de células blásticas no sangue periférico que os demais subgrupos. Finalizando, estes dados, sugerem que a imunofenotipagem é uma importante metodologia no diagnóstico, na monitoração da avaliação prognóstica e na determinação dos mecanismos de evolução patológica das leucemias linfóides agudas.

UNITERMOS: Anticorpos Monoclonais, Imunofenotipagem, Leucemia linfóide Aguda

SUMMARY:

The authors presents a study in untrated patients with lymphoblastic leukemia (ALL) with a methodology that includes morphological analysis and immunophenotyping with a panel of monoclonal antibodies (Mo.Ab.) specific to ALL as CD1a, CD2, CD3, CD4, CD7, CD8, CD10, CD13, CD14, CD19, CD22, CD34, anti IgM, anti light chain (*kappa*, and *lambda*) anti heavy chain mü and anti TdT, detected by standard techniques such as immunoperoxidase and flow cytometry. In addition, the authors also investigated information referring to patients as age and sex and also clinical and laboratory date such as tumoral mass, adenomegaly, hepatomegaly, esplenomegaly, infiltration of central nervous system (CNS) and number of blast cells in peripheral blood. The results demonstrated that 71 cases (56,4%) were B lineage ALL (*null*, *Comum*, *pré-B* and *B cell ALL*) and 55 T-Cell ALL (Pre-T, T-intermediary and T-medullar). In relation to the sex, this date demonstrated that the male patients were more frequents independent of the immunological classification. The correlation among the age and immunological classification showed that B lineage ALL were more frequently in children patients (age < 15 years old) and T cell ALL in adults. The relative frequency of immunological subgrups and FAB morphological classification showed a direct correlation between the L3 morfology and B Cell ALL, and L1 and L2 were more frequent in pre-B lineage ALL and T-Cell ALL respectivement. The correlation of analysis among this immunophenotype in terms of clinical pathological profile of this ALL, demonstrated that T Cell ALL were more associated to tumoral mass, infiltration of CNS and with higt levels of circulating blast cells when compared to B lineage ALL. In conclusion, this date sugest that immunophenotyping is a important methodology to diagnostic, monitor to evolution and assess the mechanisms of pathological evolution of ALL.

Key Word: Monoclonal Antibodies; Imunphenotypes; Acute Lymphoblastic Leukemia.

INTRODUÇÃO:

O diagnóstico e a classificação das leucemia, em particular das formas agudas, é um argumento de contínua evolução, visto que a correta identificação do tipo celular envolvido na leucemogênese é essencial para o diagnóstico e eventual quimioterapia.

Tradicionalmente as leucemias agudas podem ser classificadas sob o ponto de vista morfológico, por características citoquímicas e imunológicas ^(6-8, 21, 32).

A finalidade primordial da classificação morfológica é de separar as leucemias mielóides das linfóides, principalmente quando os blastos apresentam pouca ou nenhuma diferenciação celular. O grupo FAB (*French American British*) classificou as leucemias linfóides agudas (LLA) em três subtipos morfológicos: L1- caracterizada pela presença de linfoblastos pequenos e de aspecto uniformes; L2- pela presença de linfoblastos maiores, pleomórficos e com nucléolos visíveis na maioria dos casos e L3, cujos linfoblastos apresentam semelhança aos vistos no linfoma de Burkitt ⁽¹⁾.

Os critérios imunológicos por sua vez são baseados na expressão de antígenos de diferenciação celular das linhagens B e T, detectados por anticorpos monoclonais (AcMo). Sabendo-se que muitas destas moléculas são perdidas ou adquiridas ao longo da diferenciação celular, vários pesquisadores demonstraram que estas leucemias representam um grupo heterogêneo de doenças, sendo possível através destes anticorpos detectar com bastante precisão qual a linhagem celular e em que nível de diferenciação se encontra o processo leucêmico ^(8, 16, 26).

Desta forma, diversos autores têm proposto uma classificação imunológica das LLAs de acordo com a expressão de antígenos específicos, podendo inicialmente estas

leucemias serem classificadas em T e B, de acordo com as características imunofenotípicas dos linfoblastos leucêmicos, conforme mostra a figura 1 ⁽²²⁾.

Um modelo simplificado de classificação da LLAs de linhagem T foi inicialmente proposto por Reinherz, E.L. et cols ⁽²⁸⁾. Este modelo foi posteriormente confirmado e aperfeiçoado por outros autores e divide as LLAs de linhagem T em três subgrupos de acordo com a expressão de antígenos de diferenciação correspondentes aos níveis de diferenciação intratímica normal. Desta forma, o grupo I corresponde aos timócitos mais primitivos (*Células pré T*) cujas células expressam caracteristicamente o CD7, CD34 e o Terminal Desoxinucleotidil Transferase (TdT), podendo também expressarem o HLADr, o CD38 e o CD3 intracitoplasmático (cCD3). No próximo nível de diferenciação celular, estas células passam a expressar fortemente o cCD3, o CD2 e o CD1a, expressando também o CD4 e CD8 concomitantemente (células duplamente positivas), correspondendo estas células aos timócitos intermediários da diferenciação intratímica normal, sendo comumente denominadas de *LLA do tipo T intermediária*. As LLAs do terceiro grupo correspondem aos timócitos medulares, apresentando estas células dicotomia para o CD4 e CD8, perdendo a expressão do CD1a, mantendo a expressão do CD2 e do CD7, expressando caracteristicamente o CD3 de membrana (mCD3) ^(3-6, 8, 11-17, 22, 26, 29,32, 34, 36).

As leucemias de linhagem B por sua vez, foram divididas em quatro grupos, de acordo com os estágios de diferenciação normal de progenitores B na medula óssea: o primeiro grupo expressa apenas antígenos relacionados a resposta imune (HLA-Dr), além do CD19, CD34 e o TdT, sendo denominada de *LLA do tipo Null*. O segundo tipo corresponde as *LLA pré B do tipo Comum* ou *CALLA Positiva*, cujo fenótipo apresenta HLADr+, CD19+ e o *Antígeno Comum da Leucemia Linfóide Aguda (CALLA)* ou CD10+, expressando também o CD22 intracitoplasmático (cCD22). As características do terceiro grupo desta linhagem de LLA é a presença intracitoplasmática da cadeia pesada “ μ ” das imunoglobulinas (c μ), além do HLADr, CD10, CD19, CD22 de membrana (mCD22) e o CD20. Finalmente, no quarto e ultimo estágio, encontram-se as leucemias que morfologicamente correspondem ao tipo Burkitt, caracterizando-se

imunologicamente pela expressão completa de Imunoglobulina de superfície (SmIg+) (6, 12-17, 20, 26-27, 29, 31, 37).

Diante destas informações, o objetivo deste trabalho é investigar um grupo de leucemia linfóide aguda (LLA) baseado em critérios morfológicos, citoquímicos e na expressão imunofenotípica de antígenos de membrana e intracitoplasmáticos detectados por AcMo com metodologias que incluem a citometria de fluxo e reação imunoenzimática da imunoperoxidase conjugada, assim como a correlação destes dados com as características clínicas e laboratoriais destas leucemias.

CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

1-Pacientes

Foram analisados no Laboratório de Marcadores Celulares do Instituto Nacional de Câncer-RJ, 126 pacientes com o diagnóstico prévio de LLA antes de qualquer intervenção terapêutica. O material analisado consistiu de células blásticas oriundas de aspirado de medula óssea e sangue periférico as quais foram submetidas a um estudo morfológico, citoquímico e de imunofenotipagem.

Paralelamente às amostras analisadas, foram obtidas sobre a idade e sexo, além de dados clínicos tais como a presença de linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, presença de massas tumorais e infiltração leucêmica no sistema nervoso central (SNC).

Foram excluídos deste trabalho os casos em que os pacientes apresentavam morfologia das células blásticas compatível com leucemia mielóide aguda (LMA), expressão de antígenos mielóides (CD13) e ou monocíticos (CD14), além da quimioterapia antileucêmica prévia.

2- Citomorfologia e Citoquímica

Para o diagnóstico das leucemias agudas seguiu-se o critério da observação da presença de mais de 25% de células blásticas no aspirado de medula óssea, cuja avaliação morfológica seguiu os critérios da classificação FAB, conforme os subtipos L1, L2 e L3 em distensões de sangue periférico e medula óssea corados pelo May-Grunwald-Giensa^(1, 6, 7).

Colorações citoquímicas adicionais foram realizadas com o objetivo de auxiliar na caracterização morfológica das LLAs estudadas. Desta forma, a coloração citoquímica do Negro de Sudan (NS) foi inicialmente realizada com o objetivo de exclusão dos casos de leucemia mielóide aguda (LMA); a reação do Ácido Periódico de Schiff (PAS), no auxílio da caracterização morfológica das LLAs e a reação da Fosfatase Ácida (F.Ac.) mostrou-se útil na caracterização das leucemias de células T, apresentando nestes casos, uma grande granulação intracitoplasmática única fortemente positiva e de disposição polar⁽⁷⁾.

O sangue periférico dos pacientes foi coletado em frascos do tipo “vacutainer” com EDTA potássico para hemograma rotineiro. A leucometria foi realizada no analisador hematológico “Cell-Dyn 3000” e a contagem diferencial em distensões de sangue periférico após coloração pelo May-Grünwald-Giensa.

Já a contagem de células no líquido cefalorraquidiano foi realizada na câmara de Fuchs-Rosenthal e a diferencial foi obtida de citocentrifugados celulares. Neste caso, 100 µl do líquido sem preservativo foi citocentrifugado em uma citocentrífuga a 400 rpm por 5 minutos. Consideramos acometimento do SNC ao diagnóstico quando havia mais que 5 células por mm³ e quando as mesmas apresentavam características blásticas no citocentrifugado corado pelo May-Grunwald-Giensa⁽²⁰⁾.

3- Separação de células leucêmicas e preparação de citocentrifugados celulares.

Células leucêmicas oriundas de aspirado de medula óssea e / ou de sangue periférico colhidas com heparina (Liquemine, Roche, USA) foram separadas em gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma, USA) em centrifuga refrigerada durante 20 minutos a 1500 rpm. Após a centrifugação, o anel na interface formado por células mononucleares foi cuidadosamente colhido com pipeta pasteur, ressuspendido em tubos cônicos e lavado três vezes com PBS (Ph=7,2) com 10% de soro bovino fetal.

A partir da suspensão de células mononucleares a concentração foi reajustada em $1,6 \times 10^6$ células por ml para cada teste com AcMo específico quando testado pela

imunofluorescência e para confecção de citocentrifugado celular. Neste caso, 100 µl de suspensão celular foi centrifugada em uma citocentrífuga durante 5 minutos a 400 rpm.

4-Imunofenotipagem

A imunofenotipagem foi realizada com um painel de AcMo específico para leucemias agudas conforme mostra o quadro 1, com técnicas que possibilitaram detectar a expressão de antígenos celulares de superfície, intracitoplasmáticos e nuclear como a imunofluorescência e a reação imunoenzimática da imunoperoxidase conjugada ^(4-5, 12,16-18, 29, 33, 36-37).

A imunofluorescência foi realizada em suspensão de células frescas quando incubadas com AcMo específicos e posteriormente a uma imunoglobulina anti fragmento Fc de camundongo, conjugado a isotiocianato de fluoresceína (Capell, Londres, Inglaterra). Quando se utilizaram AcMo anti cadeias leves das imunoglobulinas kappa (κ) ou lambda (λ) já fluoresceinadas as reações foram então realizadas em uma única etapa de incubação. Em todos os casos analisados, utilizou-se um controle de autofluorescência inespecífica do conjugado IgG fluoresceinado, no qual a primeira camada de AcMo foi omitida.

A análise foi realizada em um citometro de fluxo (*Facs-Can da Becton Dickinson, San-José, Ca, USA*), utilizando-se o programa Lisis II, com aquisição de 10.000 eventos, levando-se em conta os parâmetros *Forward Scatter* (FSC) em escala linear que avalia o tamanho celular, *Side Scatter* (SSC) também em escala linear, o qual avalia a complexidade e granulosidade celular, e FL1 em escala logarítmica que detecta a fluorescência verde ou seja a reação antígeno anticorpo conjugado ao isotiocianato de fluoresceína ⁽³⁰⁾.

Os resultados foram fornecidos na forma de histogramas em percentagens da população celular com reação positiva ou negativa e intensidade de fluorescência, conforme nos mostra as figuras 2 e 3.

A reação imunoenzimática empregada neste estudo foi a da imunoperoxidase conjugada em citocentrifugados celulares, utilizando neste caso, duas camadas de 20 µl de anticorpos conjugados a peroxidase (Imunoglobulina de coelho anti anti IgG de

camundongo e imunoglobulina de porco anti IgG de coelho, *Dako Ltda, Sta Barbara, Ca, USA*). Esta técnica foi empregada nos casos em que o baixo número de células impossibilitaram o estudo pela imunofluorescência, quando na complementação da primeira análise ou ainda na pesquisa da expressão de antígenos intracitoplasmáticos e nucleares como o cCD3, cCD22, cμ e TdT^(4, 12, 23, 25, 29).

As imunofenotipagens foram consideradas positivas por ambas as técnicas quando ocorreram mais de 20% de células blásticas positivas para a maioria dos AcMo. No caso de marcadores de células progenitoras como o TdT e o CD34 por serem muito específicos, foram considerados positivas quando o número de células marcadas foi igual ou superior a 10%^(5, 13, 17, 23-30).

É importante ressaltar a importância da contagem de apenas células blásticas, principalmente em material analisado a partir de sangue periférico e com pequeno percentual de células leucêmicas, visto que grande parte destes marcadores também se expressam em células linfóides maduras, principalmente marcadores relacionados a células T como o CD2, CD3, CD4, CD8, e o CD7, bem como o CD19, CD22 e o HLA-Dr. Na avaliação das *LLA do tipo CALLA* este procedimento é desnecessário visto que o CD10 não se expressa em linfócitos periféricos normais⁽²⁷⁾.

RESULTADOS:

Os dados referentes a classificação imunológica das LLAs estão inseridas na figura 4, demonstrando que 55 casos eram de *LLA de Células T* e 71 de *LLA de linhagem B*.

Chamou-se de *LLA de Células T* quando mais de 20% das células blásticas apresentavam positividade para antígenos pan-T ou seja CD3 e CD7, segundo os critérios propostos por Reinherz, E.L. et cols⁽²⁸⁾ e Freedman, A.S & Nadler, L.M.⁽¹³⁾. Neste grupo de LLA, 14 casos (11,1%) apresentavam um fenótipo característico de *LLA pré T* ou seja: CD7+, cCD3+, HLADr+, CD34+ e TdT+. As *LLA do tipo T intermediária* consistiram de 12 casos (9,2%), cujo fenótipo caracterizou-se pela positividade ao CD1a e ao CD2, e também pela expressão simultânea do CD4 e CD8, mantendo a expressão do CD7, e o cCD3, podendo ainda expressarem o CD34, o HLADr e o TdT. Ainda no grupo das LLA de Células T, 29 casos (23%) foram *LLA do*

tipo medular cujas características principais foram a expressão seletiva do CD4 e CD8 da mesma forma que os linfócitos T maduros assim como a expressão do CD3 de superfície (mCD3), cujos resultados encontram-se na tabela 1.

Apesar de não se ter utilizado técnicas de dupla marcação para estas células o que demonstraria sem qualquer sombra de dúvida a expressão simultânea deste marcadores numa mesma célula, acreditamos que a superposição de percentuais com valores elevados para estes marcadores reflita na confiabilidade destes resultados.

A distribuição das LLA de linhagem B também está contida na figura 4 cuja características imunológicas encontram-se resumidas na tabela 2. Estas leucemias foram assim denominadas quando mais de 20% das células leucêmicas apresentaram antígenos descritos como de linhagem B e pré-B, conforme os critérios descritos por Drexler, H.G. et cols ⁽¹²⁾, Freedman, A.S. & Nadler, L.M. ⁽¹³⁾, Foon, K.A. & Todd, E.D. ⁽¹⁵⁾ e Pui, C.H & Crist, W.M. ⁽²⁶⁾. Neste grupo, 6 casos (4,8%), apresentavam um fenótipo, característico de *LLA pré-pré B (Null)*, ou seja, expressaram apenas o CD19, HLADr e o CD34 em suas células blásticas na maioria dos casos. As *LLA do tipo COMUM* ou *CALLA* positiva representaram 48 casos (38,1%), cujo fenótipo demonstrava a aquisição do CD10, além da expressão do CD19, cCD22 e do HLADr na maioria dos casos. As *LLA pré-B (cμ+)* representaram o total de 6 casos (4,8%) as quais expressavam caracteristicamente a cadeia pesada “*mü*” das imunoglobulinas no interior do citoplasma (cμ+), além do CD19, HLADr, CD10 e o cCD22. E finalmente, 11 casos (8,7%) foram de *LLA-B* cujas células blásticas apresentaram a expressão completa das imunoglobulinas de superfície (SmIg+), expressando ainda caracteristicamente estas células tumorais apenas um tipo de cadeia leve das imunoglobulinas (κ ou λ), reafirmando desta forma a monoclonalidade desta população celular ⁽³⁷⁾.

Na tabela 3 encontram-se resumidos os dados gerais referêntes aos grupos estudados, que incluem a idade, o sexo e algumas características laboratoriais destes pacientes como a leucometria e percentual de células blásticas no sangue periférico.

Desta forma, pode-se observar uma predominância de indivíduos do sexo masculino acometidos pela doença, independentemente da imunofenotipagem. Assim

sendo, nas LLA do tipo *Null*, observou-se que 83,3% dos casos foram de indivíduos do sexo masculino e 16,7% do sexo feminino; nos 48 casos de LLA do tipo *comum*, 27 casos (56,2%) eram de indivíduos do sexo masculino e 21 (43,8%) do sexo feminino; das LLA *pré B* ($c\mu+$), 4 casos (66,7%) eram do sexo masculino e 2 (33,3%) do sexo feminino; e nos 11 casos de *LLA-B*, 8 (72,7%) eram do sexo masculino e 3 (27,3%) do sexo feminino. Nas *LLA de células T*, constatou-se a mesma tendência, onde dos 55 pacientes estudados, 39 (70,9%) eram do sexo masculino e 16 casos (29,1%) do sexo feminino.

A faixa etária dos grupos estudados oscilou de 1 a 63 anos. Desta forma, nas *LLA do tipo null* a idade variou de 4 a 40 anos, com mediana de 15; nas *LLA do tipo COMUM*, de 4 a 25 anos com 8 de mediana; nas *LLA pré-B* ($c\mu+$) de 1 a 25 e mediana de 18 e nas *LLA-B* ($SmIg+$), de 4 a 21 anos. Nas *LLA de células T*, entretanto a idade variou de 1 a 63 anos com 32 de mediana.

Na tabela 4 encontram-se resumida a correlação da imunofenotipagem, e colorações citoquímica. A reação para o Ácido Periódico de Schiff (PAS), mostrou-se positivo em praticamente todos os grupos imunológicos das LLA estudadas, sendo negativa apenas nas *LLA-B* ($SmIg+$). Desta forma, nas *LLA-Null* esta reação foi positiva em 02 casos (33,3%), em 10 casos (20,8%) das *LLA do tipo COMUM*, em 02 casos (33,3%) das *LLA pré-B* ($c\mu+$) e em 19 (34,5%) casos das *LLA de células T*. Já a coloração para a Fosfatase Ácida mostrou-se útil na investigação das *LLA de células T*, apresentando caracteristicamente uma positividade fortemente polar em 48 casos (83,6%), sendo negativa nos demais subtipos imunológicos e finalmente ,a coloração para o Negro de Sudan por sua vez foi negativa em todas as LLAs estudadas.

Na figura 5, observou-se resumidamente a correlação dos subtipos imunológicos destas leucemias com a faixa etária, representados por indivíduos adultos (com idade maior ou igual que 15 anos) e infantis (menor que 15 anos de idade). Nela, constatou-se que as *LLA-T* predominou em indivíduos adultos com 35 casos (63,6%), e a incidência destas leucemias em indivíduos com idade inferior a 15 anos foi de 20 casos (36,4%). Já nas leucemias de linhagem B, observou-se uma maior incidência em indivíduos com idade inferior a 15 anos na maioria dos casos. Desta forma, nos 48 casos de *LLA do tipo COMUM*, 36 (75%) apresentaram idade inferior a 15 anos e

apenas 12 casos (25%) idade igual ou superior a 15 anos; nos 6 casos de *LLA-pré B* ($c\mu+$), 4 tinham idade menor que 15 anos (66,7%) e 2 (33,3%) maior ou igual que 15 anos. Das *LLA-B* ($SmIg+$) estudadas, 8 casos (72,7%) apresentavam idade inferior que 15 anos e 3 (27,8%) idade maior ou igual a 15 anos. Nas *LLA-Null*, não observou-se predominância de nenhuma das faixas etárias, apresentando números iguais de adultos e crianças afetados.

A tabela 5 mostra a correlação da imunofenotipagem das *LLA* estudadas com classificação FAB. Dos 126 casos de *LLA* estudadas, 57 eram de *LLA* do tipo L1, 58 do tipo L2 e 11 casos corresponderam ao tipo L3. Todas as leucemias de células precursoras B demonstraram uma predominância da correlação com o tipo morfológico L1 da classificação FAB. Desta forma, nos 6 casos de *LLA do tipo Null*, 5 (83,3%) as células blásticas apresentaram características morfológicas L1 e 1 caso (16,7%) com o tipo L2; nas *LLAs do tipo Comum*, 30 casos (62,5%) correspondiam ao tipo L1 e 18 (37,5%) ao L2, sendo a mesma tendência também observada nas *LLAs pré-B* ($c\mu+$), onde dos 6 casos estudados, 5 (83,3%) eram L1 contra 1 caso (16,6%) L2. Já as *LLA-T* entretanto, correlacionaram-se mais com blastos do tipo L2, os quais corresponderam a 38 casos (69,1%) contra 17 (30,9%) correspondentes ao tipo L1. Todos os casos de *LLA-B* ($SmIg+$) tiveram as suas células blásticas morfológicamente correspondentes ao tipo L3 da classificação FAB.

Na tabela 6, observou-se a correlação da classificação imunofenotípica das leucemias estudadas com o aspecto clínico tumoral, traduzido pela presença de linfadenopatias, hepatomegalias, esplenomegalias, presença de massas tumorais (abdominal e mediastinal), além de infiltração leucêmica no SNC.

Nesta tabela, observou-se que a linfadenopatia esteve presente na maioria dos casos estudados, com valores maiores que 50% na maioria dos casos. Desta forma, nas *LLA do tipo Null*, este achado clínico foi observado em 4 casos (66,6%); em 25 casos (52,1%) das *LLA do tipo COMUM*; em 3 casos (50,0%) das *LLA-pré-B* ($c\mu+$); em 9 casos (81,8%) das *LLA-B* ($SmIg+$); e em 30 casos (54,5%) das *LLA de Células T*.

A presença de esplenomegalia assim como a hepatomegalia também foi observada na maioria dos casos estudados. Desta forma, a esplenomegalia foi

constatada em 3 casos (50%) das *LLA do tipo Null*; em 24 casos (50%) das *LLA do tipo COMUM*; em 4 casos (66,7%) das *LLA pré-B (cμ+)*, em 10 casos (90%) das *LLA-B (SmIg+)*; e em 31 casos de *LLA de Células T*. A hepatomegalia, por sua vez, foi observada em 3 casos (50%) das *LLA do tipo Null*; em 24 casos (41,7%) das *LLA DO TIPO COMUM*; em 4 casos (66,7%) das *LLA pré-B (cμ+)*; em 4 casos (36,4%) das *LLA-B (SmIg+)*; e em 27 casos de *LLA de Células T*.

A presença de massas tumorais foi observada apenas nas *LLA de células B e T*. Destes, a freqüência de massas abdominal foi constatada em 10 indivíduos (90,9%) portadores de *LLA-B* e em 1 caso (1,8%) de indivíduos com *LLA de Células T*. Já a presença de massa mediastinal foi detectada apenas em alguns indivíduos com *LLA de Células T*, perfazendo um total de 31 casos (56,4%) deste tipo de LLA.

O acometimento do sistema nervoso central ao diagnóstico foi observado em 8 casos (11,7%) das *LLA do tipo COMUM*, em 02 casos (18,2%) das *LLA-B* e em 11 casos (20%) das *LLA de Células T*.

A correlação da leucometria com os resultados das imunofenotipagens das leucemias estudadas está resumida na tabela 5. Nela, pode-se constatar que a leucometria variou de menos de 5.000 \ mm^3 até valores superiores a 100.000 \ mm^3 , na maioria dos casos. Leucometria com valores inferiores a 5.000 \ mm^3 foi observada na maioria dos casos embora em percentual pequeno, estando ainda esta contagem ausente nas *LLA de Células T*. Desta forma, ela foi observada em 1 caso (16,7%) de *LLA do tipo Null*, em 4 casos (8,3%) das *LLA do tipo COMUM*, em 01 caso (16,7%) das *LLA-pré B (cμ+)* e em 02 casos (18,2%) das *LLA-B*.

A leucometria variando entre 5.000 e 10.000 \ mm^3 foi observada em 11 casos (22,9%) dos indivíduos com *LLA do tipo COMUM*, em 02 casos (18,2%) de *LLA-B* e em 09 casos (16,4%) de *LLA-T*.

Valores compreendidos entre 10.000 \ mm^3 e 50.000 \ mm^3 foram observadas em 3 casos (50%) das *LLA-Null*, em 12 casos (25%) das *LLA do tipo COMUM*, em 3 casos (50%) das *LLA pré B (cμ+)*, em 4 casos (36,4%) das *LLA-B* e em 12 casos das *LLA de Células T*.

Já a contagem compreendida entre 50.000 \ mm^3 e 100.000 \ mm^3 foi presenciada na maioria das LLA estudadas. Desta forma, ela foi observada em 02 casos (33,3%) das *LLA do tipo Null*, em 09 casos (18,8%) das *LLA do tipo COMUM*, em 01 caso (9,0%) das *LLA-B (SmIg+)* e em 14 casos (25,4%) das *LLA-T*.

Finalmente, pacientes com hiperleucocitose (leucometria $> 100.000 \text{ \ mm}^3$) foi constatada em 12 casos (25%) das *LLA do tipo COMUM*, em 2 casos (33,3%) das *LLA pré B (c μ +)* , em 2 casos (18,2%) das *LLA-B (SmIg+)* e em 20 casos (36,4%) das *LLA de células T*.

A contagem de células blásticas no sangue periférico variou de 10 a 100% na maioria dos casos estudados. Desta forma, contagens variando entre 10 a 20% estiveram presentes em 6 casos (12,5%) das *LLA do tipo COMUM*, em 1 caso das *LLA pré B (c μ +)* e das *LLA-B (SmIg+)*, totalizando 16,7% e 9,1% destes casos respectivamente, e em 4 casos (7,3%) das *LLA de Células T*.

Números percentuais de células blásticas variando entre 21 a 30% foram constatadas em 2 casos (4,2%) das *LLA do tipo COMUM*, e em 1 caso das *LLA pré B (c μ +)* (16,7%) e *B (SmIg+)* (9,1%) e, em 4 casos (7,3%) das *LLA de Células T*.

Já valores compreendidos entre 31 a 60%, e maior que 60%, mostram-se presentes em todos os grupos de LLA estudadas. Assim sendo, o percentual de células blásticas oscilando entre 31 a 60% foi observada em 2 casos (33,3%) das *LLA do tipo Null e pré B (c μ +)* em 5 casos (10,4%) das *LLA do tipo COMUM*, em 4 casos (36,4%) das *LLA-B (SmIg+)* e em 11 casos (20%) das *LLA de Células T*. Finalmente, contagens maiores que 60% estiveram presentes na maioria dos casos de todos os grupos de LLA estudados, sendo observada em 4 casos (66,7%) das *LLA do tipo Null*, em 35 casos (72,9%) das *LLA do tipo COMUM*, em 2 casos (3,3%) das *LLA pré B (c μ +)* , em 5 casos (45,5%) das *LLA-B (SmIg+)* e em 36 casos (65,4%) das *LLA-T*.

DISCUSSÃO:

A introdução do emprego de anticorpos monoclonais no estudo das leucemias possibilitou definir com maior precisão os distintos estágios de proliferação celular das leucemias em geral. Além disso, vários estudos tem demonstrado evidências de que o fenótipo imunológico das células envolvidas na leucemogênese tem importância no

prognóstico juntamente com outras variáveis como a leucometria, idade, sexo, e classificação morfológica (6, 8-9, 11-15, 21-22, 26-28, 30-37).

Embora muitos destes antígenos sirvam operacionalmente como marcadores de diferenciação celular, várias destas moléculas são na verdade moléculas de adesão celular ou outros tipos de glicoproteínas com funções estabelecidas na comunicação intercelular, como receptores para fator de crescimento, citocinas, imunoglobulinas e moléculas do sistema complemento, além de receptores para vírus⁽¹⁵⁾.

As leucemias de linhagem B representam segundo a literatura cerca de 80% dos casos, sendo definidas imunologicamente pela expressão do CD19, que é um marcador pan-B e também pela demonstração do rearranjo dos genes das imunoglobulinas por técnicas de biologia molecular (6, 8, 12-17, 18-22, 25-27, 31-33, 36-37).

As LLAs de linhagem T por sua vez, representam cerca de 15 a 20% de todos os casos de LLA e estão mais relacionadas com fatores de mau prognóstico como a leucometria elevada, presença de massas tumorais, linfadenopatia generalizada e infiltração no SNC. Estas leucemias foram inicialmente identificadas pela presença de receptores para hemácias de carneiro, além da coloração intracitoplasmática fortemente positiva e de disposição polar para fostatase ácida. Entretanto, as características laboratoriais mais importantes destas leucemias é a expressão de antígenos pan-T ou seja do CD3 (intracitoplasmático e de membrana) e do CD7 (3-8, 11-19, 22-23, 27-29, 32).

Embora clinicamente não pareça haver diferenças entre as LLA *pré-T*, *intermediárias* ou *medular*, alguns autores definem a *LLA-T* com o perfil CD7+, CD4-, CD8- como as que evoluem com pior prognóstico, com resistência aos regimes terapêuticos utilizados (3, 19). Outros autores entretanto, correlacionam o ultimo estágio de diferenciação intratímica (mCD3+) juntamente com as *LLA-T* cujas células blásticas expressam o receptor para transferrina (CD71) como as que evoluem para um mau prognóstico (26).

O prognóstico e evolução clínica de indivíduos com LLA dependem de uma série de fatores os quais procuram estratificar os pacientes em diferentes grupos de risco, levando-os a diferentes estratégias de tratamento. As principais variáveis incluem: a idade, o sexo, a leucometria inicial, a raça, anormalidades citogenéticas, a imunofenotipagem e resposta ao tratamento. A combinação destes fatores tem sido utilizada para definir fatores de risco e orientação terapêutica (6, 8, 26, 32).

Dentre os fatores tidos como favoráveis, destacamos a faixa etária variando entre 2 a 10 anos, leucometria inferior a $20.000 \text{ \ } \text{mm}^3$, ausência de organomegalias, perfil imunofenotípico *pré-B COMUM* (CD10 positivo e $\text{c}\mu$ negativo), hiperdiploidia, sexo feminino, subtipo morfológico L1 e pequeno percentual de células blásticas na medula óssea ^(6, 8, 26, 32).

Já entre os fatores descritos como desfavoráveis destacam-se a idade inferior a 1 e maior que 10 anos, contagem de leucócitos superior a $50.000 \text{ \ } \text{mm}^3$, volumosas organomegalias, subtipos imunológicos T, B e *Nullo*, sexo masculino, subtipos morfológicos L2 e L3, contagem elevada de células blásticas na medula óssea e no sangue periférico, não resposta ao tratamento de indução e alterações citogenéticas dentre as quais destacam-se a hipodiploidia assim como translocações cromossômicas, dentre as quais: t(9; 22), t(8;14), t(4; 11), t(1; 19) ^(6, 8, 32).

A hepatomegalia e a linfadenopatia geralmente estão presentes na maioria dos casos. Outras manifestações clínicas porém menos freqüentes também podem estar presentes ao diagnóstico sendo geralmente mais relacionadas como fatores de mau prognóstico e incluem: infiltração testicular, manifestações neurológicas decorrentes de infiltração do sistema nervoso central por células leucêmicas, assim como a presença de massas tumorais (abdominal e mediastinal) ^(6, 8, 26, 32).

Relatos da literatura têm correlacionado subtipos imunológicos de LLA com a faixa etária. As *LLA tipo CALLA* positiva com imunoglobulina intracitoplasmática negativa representa talvez as *LLAs pré B* que apresenta um melhor prognóstico e com melhor evolução clínica, sendo este tipo de LLA mais freqüente em indivíduos com idade inferior a 15 anos, que em indivíduos adultos os quais por sua vez são mais acometidos de *LLA de Células T* ^(6, 8, 15, 26-27, 32).

Neste trabalho, constou-se esta tendência, onde dos 48 indivíduos com *LLA CALLA* positiva e $\text{c}\mu$ negativo predominou em indivíduos com idade inferior a 15 anos, com 73% dos casos, ao passo que nas *LLA de células T* acometeu mais indivíduos com na faixa etária maior ou igual que 15 anos.

Correlacionando os resultados das imunofenotipagens com a classificação FAB para leucemias linfoblásticas, observou-se uma tendência da correlação de

linfoblastos do tipo L1 para as leucemias de linhagem B (*Null*, *COMUM* e *pré-B cμ+*) em 83,3 %, 62,5 % e 83,3 % dos casos respectivamente. Já nas LLA de células T, entretanto, correlacionou-se mais com linfoblastos L2 com 69,1% dos 55 casos analisados. Nas *LLA-B (SmIg+)*, foi observado caracteristicamente uma correlação direta deste tipo de LLA com células blásticas cujas características morfológicas eram do tipo L3 da classificação FAB.

Estes achados mostraram-se condizentes com os achados da literatura. Segundo diversos autores, as *LLA-B (SmIg+)* correlacionam-se diretamente com o tipo morfológico L3. Os outros subtipos imunológicos (T ou pré-B) entretanto, podem apresentar blastos com morfologia L1 ou L2, sendo que células blásticas com morfologia L1 mais frequentes nas LLA de linhagem B e as com morfologia L2 mais encontradas nas LLA-T e nas LLA de linhagem B mais imaturas ^(8, 26-27, 32).

Neste trabalho, a análise dos 125 casos de LLA demonstraram uma maior incidência de manifestações tumorais nas *LLA de Células T e B (SmIg+)*, apresentando em alguns casos destas leucemias, extensas massas tumorais (abdominal e mediastinal), infiltração leucêmica no SNC, assim como linfadenomegalias generalizada e volumosas hepatoesplenomegalia na maioria dos casos.

Nos outros grupos de LLA, entretanto, algumas destas manifestações também estiveram presentes na maioria dos casos estudados. Desta forma, a linfadenomegalia, e a esplenomegalia estiveram presentes na maioria dos casos das *LLA Null*, *COMUM*, e *pré-B (cμ+)*, totalizando 66,6%, 52,1% e 50% dos casos respectivamente. Já o acometimento do sistema nervoso central esteve presente em 8 casos (16,7%) das *LLA do tipo COMUM*, apresentando, nos casos, destas leucemias, leucometria elevada, com alto percentual de células blásticas no sangue periférico.

Relatos da literatura tem associado o acometimento leucêmico do sistema nervoso central diretamente ao volume da massa tumoral do indivíduo afetado (hiperleucocitose associada a um percentual elevado de células blásticas no sangue periférico) ^(8,26,32). Alguns autores entretanto, postulam que as células leucêmicas migrariam diretamente do microambiente medular dos ossos da calota craniana ao interior do SNC, deslocando-se ao mesmo através da camada adventícia dos vasos ou,

migrando através do perineuro seguindo o trajeto dos nervos que traspassam o espaço subdural em direção as meninges^(2, 8).

Uma outra hipótese também defendida por estes mesmos autores seria de que estas células ingressariam no SNC durante os processos hemorrágicos em decorrência de trombocitopenia que comumente acometem indivíduos portadores de leucemias agudas^(2, 8).

Alguns pesquisadores têm levantado a hipótese da possibilidade de que em alguns casos estas leucemias poderiam ter seu início no interior do SNC, expandindo-se posteriormente a outras regiões como a medula óssea e o sangue periférico. Esta hipótese, é reforçada pelo fato de que durante a embriogênese, em torno do 5º mês de vida fetal, também ocorre hematopoese em algumas regiões do SNC mais precisamente, a nível dos plexos coróides e tecido mesenquimal das leptomeninges. Em torno do 8º mês esta hematopoese regride, instalando-se em outras regiões como na medula óssea, mas, o potencial para atividade hematogênica destes tecidos permaneceriam por toda a vida, sendo presumidamente ativada por um processo leucêmico⁽²⁾.

Relatos mais recentes têm demonstrado que esta manifestação clínica seria na verdade em decorrência de propriedades biológicas das células leucêmicas independente do tipo imunológico e leucometria, sendo estas propriedades traduzidas pela expressão aberrante de moléculas de adesão como o CD44, e moléculas da família das integrinas como o VLA-4 e LFA-1^(2, 5). Sabendo-se que a interação entre o SNC e o sistema imune, é regulado pela barreira hematoencefálica, a qual apresenta na sua constituição, células endoteliais especializadas que regulam a passagem de células sangüneas ao SNC, de modo a proteger o tecido cerebral de possíveis agressões do sistema imune. Sabe-se também que nos processos inflamatórios que acometem o SNC, pode ocorrer a passagem de um maior número de leucócitos através da barreira hematoencefálica em virtude de uma maior permeabilidade da mesma, e também pelo aumento da expressão de moléculas de adesão na sua superfície, assim como nos linfócitos, como tem sido observado na esclerose múltipla, encefalites virais e meningites. Partindo deste princípio, acredita-se desta forma que nas leucemias assim como em outros processos neoplásicos, as células leucêmicas através das moléculas de

adesão se fixariam às células endoteliais da barreira hematoencefálica passando ao interior do SNC através de mecanismos de adesão ^(2, 5).

A leucometria elevada associada a altas contagens de células leucêmicas no sangue periférico também têm sido constantemente relacionadas com perfil imunofenotípico e prognóstico destas doenças. As leucemias linfoblásticas com contagens de leucócitos superior a $100.000 \text{ \ } \text{mm}^3$ apresentam em geral um pior prognóstico estando constantemente relacionadas a leucemias de linhagem T^(6, 8, 26, 32).

Neste trabalho, a leucometria esteve presente em diversos níveis na maioria dos grupos de LLA estudadas, apresentando as *LLA de Células T* uma correlação mais direta com a leucometria elevada ($> 100.000 \text{ \ } \text{mm}^3$) e alto percentual de células blásticas no sangue periférico ($>60\%$) na maioria dos casos, contrastando com os demais grupos de LLA, que apresentaram leucometria em diversos níveis (tabelas 7 e 8).

Finalmente, é interessante observar que nas LLA estudadas, a expressão do CD34 e TdT estiveram mais presentes nas leucemias com pouca ou nenhuma diferenciação celular. Nas leucemias agudas, o CD34 é encontrado nos blastos com pouca diferenciação celular, principalmente nas leucemias indiferenciadas ^(12-15, 17, 22), estando neste trabalho a expressão deste antígeno mais restrita as *LLA Null* e *pré-T*, conforme podemos observar nas tabela 1 e 2.

O TdT é uma enzima nuclear expressa em células imaturas de linhagem B e T, desempenhando nas mesmas o papel de recombinase para o rearranjo dos genes do receptor de células T (TCR) e das imunoglobulinas, contribuindo para a diversidade genética destas células ^(13, 24). Neste trabalho, analisando a sua expressão em 42 casos de *LLA de Células T*, os 27 casos positivos se caracterizaram mais por serem do tipo *pré-T* ou *T intermediária* (Tabela 1).

Neste contexto, é importante ressaltar a importância da imunofenotipagem no estudo das leucemias, relacionando-as a eventos fisio-patológicos, notadamente das formas agudas assumindo desta forma a imunofenotipagem importância fundamental na avaliação e monitorização da evolução prognóstica, bem como para avaliação dos mecanismos de evolução patológica das leucemias linfoblásticas.

CONCLUSÕES

1- O emprego de anticorpos monoclonais mostrou-se útil na caracterização das leucemias estudadas.

2- Estas leucemias apresentam uma maior incidência em indivíduos do sexo masculino independente do subtipo imunológico.

3- As LLAs de linhagem pré-B \ B ocorreram mais em indivíduos de faixa etária inferior a 15 anos ao passo que as LLA de Células T acometeu mais indivíduos da faixa etária superior a 15 anos.

4- As LLAs de Células T e B (SmIg+) correlacionaram-se mais diretamente com fatores de mau prognóstico tais como leucometria elevada, presença de massas tumorais e infiltração no sistema nervoso central que os demais subtipos imunológicos.

5- Células blásticas oriundas das LLA-B (SmIg+) apresentaram uma correlação direta com o subtipo morfológico L3 da classificação FAB em todos os casos analisados.

6- Os demais subtipos imunológicos não apresentaram uma correlação direta com os subtipos L1 e L2 da classificação FAB, havendo porém um predomínio do subtipo L2 nas LLA de células T e L1 nas LLA de linhagem B.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1- Bennett, J.M.; Catovsky, D.; Daniel, M.T.; Flandrin, G.; Galton, D.A.G.; Gralnick, H.R. & Sultan, C. - The morphological classification of acute lymphoblastic leukaemia: Concordance among observers and clinical correlations *British Journal of Haematology*, 47: 553-561, 1981.

2- Bleyer, W.A. - Biology and pathogenesis of CNS leukemia. *Am. J. Hematology Oncology*. 11 (1): 57-69,1989.

3- Breit, T.M., Wolvers-Tettero, I.L.M. & Van Dongen, J.J.M. - Phenotypic characteristics of human early T-cell differentiation: the T-cell acute lymphoblastic leukaemia model. *Research in Immunology*. 2: 139-143, 1994.

4- Campana, D.; Thompson, J.S.; Amlot, P.; Brown S. & Janossy G. - The cytoplasmic expression of CD3 antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage. *Journal of Immunology*. 138: 648-653, 1987.

5 Cavalcanti Junior, G.B.; Savino, W.; Maia, R.C.; Dobbin, J.A.; Carriço, M.K Cabral Harab, H. & Pombo De Oliveira, M.S. - Expressão da Molécula de Adesão CD44 nas Leucemias Linfóides Agudas. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 28 (1): 2-7,1996.

6- Cotran, R.S.; Kumar, V. & Robbins, S.L. in: *Robbins- Pathologic Basis of Disease*, Editora W. B. Saunders Company. 5^a Edição, 1994. Cap 14, pag: 629-672.

7- Dacie, J.V. & Lewis, S.M. in: *Practical Haematology*, Editora Churchil Livigstone, 1984, cap. 6, pag. 84-116.

8-Domesshek, W. & Gunz's, F. in: *Leukemia*, Editora W.B Sauders Company. 5^a edição, 1990, cap 6 (Immunology), pag 105-130; cap. 9 (Pathology of leukemia), pag 163-202; cap.30 (Central nervous system leukemia) pag.733-768.

9- Dayton, V.D.; Arthur, D.C.; Gajl-Peczalska, K.J. And Brunning, R. - L3 acute lymphoblastic leukemia. Comparasion whitth small noncleaved cell lymphoma involving the bone marrow. *Hematopathology*. 100: 130-139, 1994.

10- de Vries, H.E.; Mour, A.C.E.; Bloom-Rosemalem, M.C.M.; de Boer, A.G.; Breimer, D.B.; Van Berrkel, T.J.C. & Kuiper, J. - Lymphocyte adhesion to brain capillary endothelial cells in vitro. *Journal of Neuroimmunology*. 52: 1-8,1994.

11- Digel, W.; Shultze, J.; Kunzmann, S.R.; Mertelsmaw, R. & Lindemann, A. - Poor prognosis of prethymic phenotype in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 8: 1406-1408, 1994.

12- Drexler, H.G.; Gignac, S.M. & Minowada, J. - Routine immunophenotyping of acute leukaemia. *Blut*. 57: 327-339, 1988.

13- Fredman, A.S. & Nadler, L.M. - Cell surface markers in hematologic malignancies. *Seminars in Oncology*, 14 (2): 193-212, 1987.

14- Fredman, A.S. - Expression and functions of adhesion receptors on normal B cell non Hodgkin's lymphomas. *Seminars in Hematology*, 30 (4): 318-328, 1993.

15- Foon, K.A. & Todd, E.D. - Immunological classification of leukemia and lymphomas. *Blood*, 68 (1): 1-31, 1986.

16- Hannet, I.; Yuksel, F.E.; Lydyard, P.; Deney, S.V. & Debruyere, M. - Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. *Immunology Today*. 13: 215-218, 1992.

17- Hyun, B.H. - Diagnostic Hematology: Current Technology and its Clinical Application. *Hematology / Oncology Clinics of North America*. 8: 593-861, 1994.

18- Krause, J.R.; PENCHANSKY, L.; Contis, L. & Kaplan, S.S. - Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*. 89: 341-346, 1987.

- 19- Kurtzberg j.; Waldman T.A.; Davey M.P. & Haynes B.F.** - CD7+ \ CD4- \ CD8- acute leukemia: A syndrome of malignant pluripotent lymphohematopoietic cells. *Blood* 73: 381-390,1989.
- 20- Lauer, S.J; Kirchner, P.A. & Camitia, B.M.** - Identification of leukemic cells in the cerebrospinal fluid from children with acute lymphoblastic leukemia: advances and dilemmas. *The American Journal of Pediatric Hematology \ Oncology*.11 (1): 64-73,1989.
- 21- Loken, M.R.; Grenier, K.A. & Bach, B.A.** - A selected 12-.reagente immunophenotyping panel facilitates assignment of lineage in acute leukemia. *Becton Dickinson Immunocytometry Sysems, Clinical Monograph N° 3*: 1-28, 1992.
- 22- Matutes, E.** - Contribution of Immunophenotype in the diagnosis and classification of haemopoetic malignancies. *Journal of Clinical Pathological*. 48: 194-197, 1995.
- 23- Mehrdad, N.** - The potential value of immunoperoxidase techniques in diagnostic cytology. *Acta Cytologic*. 24: 442-447, 1980.
- 24- Orazi, A.; Cotton, J.; Cattoretti, G.; Koylo, P.K.; Johon, K.; Manning, J.T. & Neiman, R.S.** - Terminal deoxynucleotidyl Transferase staining in acute leukemia and normal bone marrow in routinely processed paraffin sections. *Hematopathology*. 102 (5): 640-645, 1993.
- 25- Pombo de Oliveira, M.S. & Tabak, D.G.** - The significance of phenotyping leukemias using monoclonal antibodies. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 23: 763-772, 1990.

26- Pui, C.H.; Behm F. & Crist, W.M. - Clinical and biological relevance of immunologic marker studies in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, 82 (2): 343-362, 1993.

27- Rajalekshmy, K.R.; Abitha, A.R.; Pramila, R.; Gnanasagar, T.; Mattre, V. & Shanta, V.- Immunophenotyping of acute lymphoblastic leukaemia in Madras, India. *Leukemia Research*. 18 (3): 183-190, 1993.

28- Reinherz, E.L.; Kung, P.C.; Goldstein, G.; Levey, R.H.; & Schollossman, S.F. - Discrete stages of human intratymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblast of T cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 1588-1591, 1980.

29- Rani, S.; Pombo de Oliveira, M.S. & Catovsky, D. - Different expression of CD3 and CD22 in leukemic cells according to whether tested in suspension or fixed on slides. *Hematologic Pathology*. 2 (2): 73-78, 1988.

30- Ruiz-Arguelles, A. - Flow cytometry in the clinical laboratory. Principles applications and problems. *Clin. Chem. Acta*. 221: 13-27, 1992.

31- Ryan, D.H. - Adherence of normal and neoplastic human B cell precursors to bone marrow microenvironment. *Blood Cells*. 19: 225-244, 1993.

32- Sans-Sabrafen, J. in: *Hematologia Clínica*. Editora Mosby \ Doyma Libros, 3^a edição, Madri, Espanha, 1994, Cap. 19-21, pag. 303-343.

33- Smith, B.R.; Weinberg, D.S.; Robert, N.J. et al. - Circulating monoclonal B lymphocytes in non-Hodgkin's lymphoma. *New England Journal of Medicine*, 38: 161-177, 1986.

34 -Shortmann, K. - Cellular aspects of early T-cell development. *Current Opinion Immunology*. 4: 140-146, 1992.

35- Stucki, A.; Cordey, A.S.; Monai, N.; Schapira, M. and Spertini O. - Activation of vascular endothelial cells by leukemic blast cells: A mechanism of leukostasis. *Blood, Journal of the American Society of Hematology*. Vol 86 (10), suppl. 1: 435 abstracts.

36- Van 'T Veer, M.B.; Van Putten, W.L.J.; Verdonck, L.F.; Ossenkoppele, G.J.; Löwenck, B.; Klui-Nelemans, J.C.; Wijernans, P.W.; Schouten, H.C; Sizoo, W. & Dekker, A.W. - Acute lymphoblastic leukaemia in adults: Immunological subtypes and clinical features at presentation. *Ann. Hematol.* 66: 277-282, 1993.

37- Weinber, D.S.; Pinkus, G.S. & Ault, K.A. - Cytofluorometric detection of B cell clonal excess: A new approach to the diagnosis of B cell lymphoma. *Blood*. 63: 1080-1087, 1984.

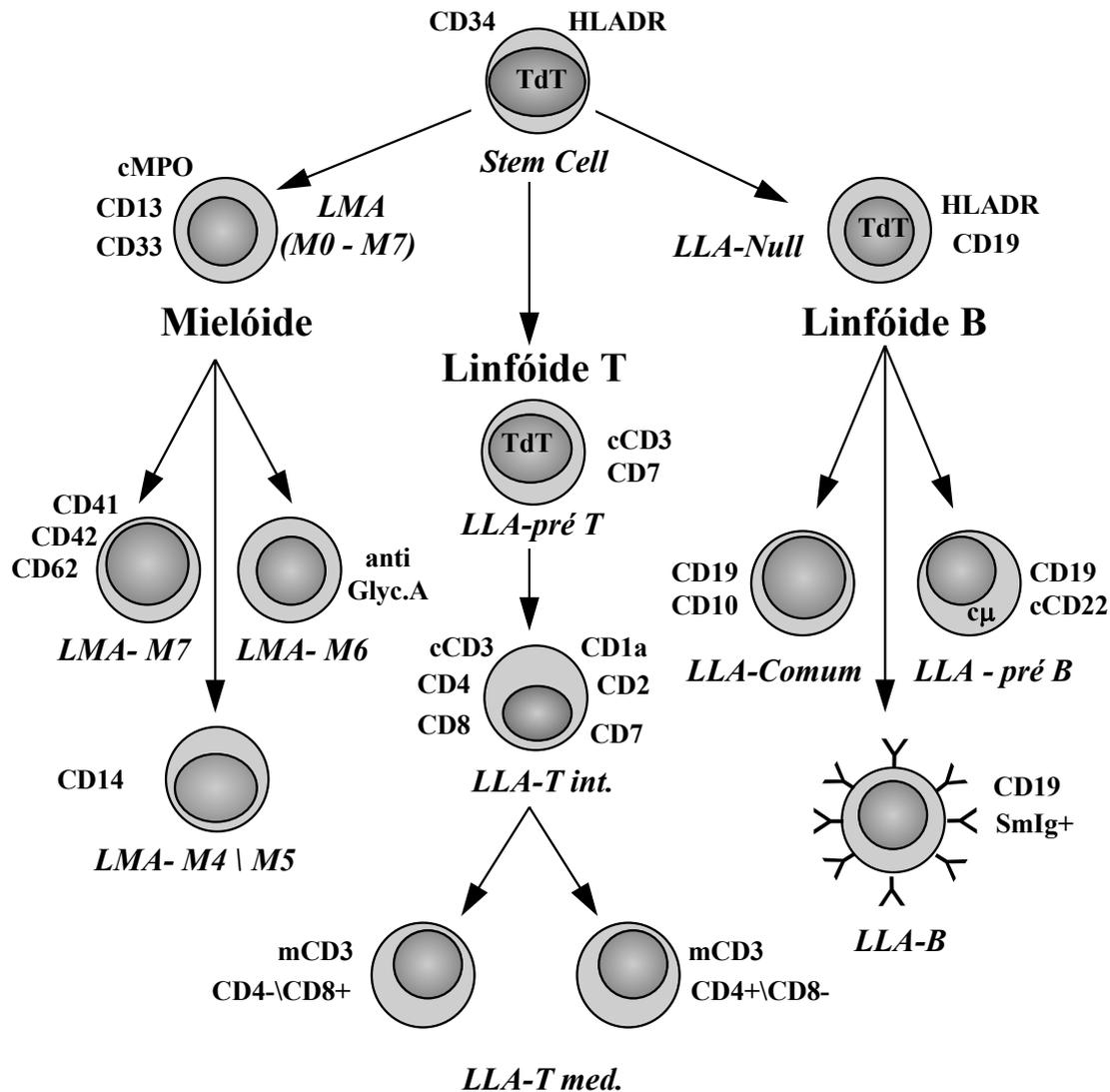


FIGURA 1: Marcadores Imunológicos e Classificação das Leucemias Agudas

Obs: *LLA-pré-T* (LLA pré-T), *LLA-T int.* (LLA de células T intermediária), *LLA-T med.* (LLA-T medular), *LLA-Null* (LLA-Null), *LLA-COMUM* (LLA do tipo COMUM), *LLA-Pré-B* (LLA- pré B $c\mu+$), *LLA-B* (LLA de células B), **cCD3** (CD3 intracitoplasmático), **mCD3** (CD3 de membrana), **cCD22** (CD22 intracitoplasmático), **mCD22** (CD22 de membrana), **$c\mu+$** (Cadeia pesada “mü” das imunoglobulinas intracitoplasmática), **LMA: M0-M7** (Leucemia Mielóide Aguda, M0-M7, segundo a classificação FAB), **cMPO** (Mieloperoxidase intracitoplasmática), **anti-Glyc.A** (Anti glycoforina alfa), **SmIg+** (Imunoglobulina de superfície), **TdT** (Terminal Desoxinucleotidil Transferase).

Baseado em **Matutes E** ⁽²²⁾.

Quadro 01:

Anticorpos Monoclonais (AcMo) empregados neste estudo

AcMo	Especificidade
Células T e Precursores:	
CD1a (Leu-6), <i>Becton Dickinson</i> CD2 (OKT 11), <i>Orto-USA</i> CD3 (Leu-3), <i>Becton Dickinson</i> CD4 (Leu-4), <i>Becton Dickinson</i> CD7 (Leu-9), <i>Becton Dickinson</i> CD8 (OKT 8), <i>Orto-USA</i>	Timocitos Corticais Receptor para eritrocitos de carneiro, linfócitos T Linfócitos pan-T Gp 56, Linfócitos T auxiliar indutor Gp 40, Linfócitos T e precursores Gp 32, Linfócitos T supressor citotóxico
Células B e Precursores:	
CD10 (anti Calla), <i>Becton Dickinson</i> CD19 (Leu-12), <i>Becton Dickinson</i> CD22(Leu-14), <i>Becton Dickinson</i> Anti μ (Anti mü chain), <i>Dako Ltda</i> Anti IgM* Anti Kappa* (Anti κ) Anti Lambda* (Anti λ)	Antígeno CALLA Linfócitos B e precursores Linfócitos B e precursores Cadeia pesada “mü” das imunoglobulinas Imunoglobulina IgM Cadeia leve Kappa das imunoglobulinas Cadeia leve Lambda das Imunoglobulinas
Mielo \ Monocíticas:	
CD13 (MY-7) CD14 (FMC-17)	Células mielóides e precursores Antígenos relacionados a monócitos
Outros:	
CD34 (MY-10) HLADR (FMC-56) TdT(Anti-TdT) Sigma Diagnostic.	Stem-cell, Células Progenitoras Antígeno de Histocompatibilidade Classe II Enzima Nuclear TdT

Obs: (*) Anticorpos já fluorosceinados.

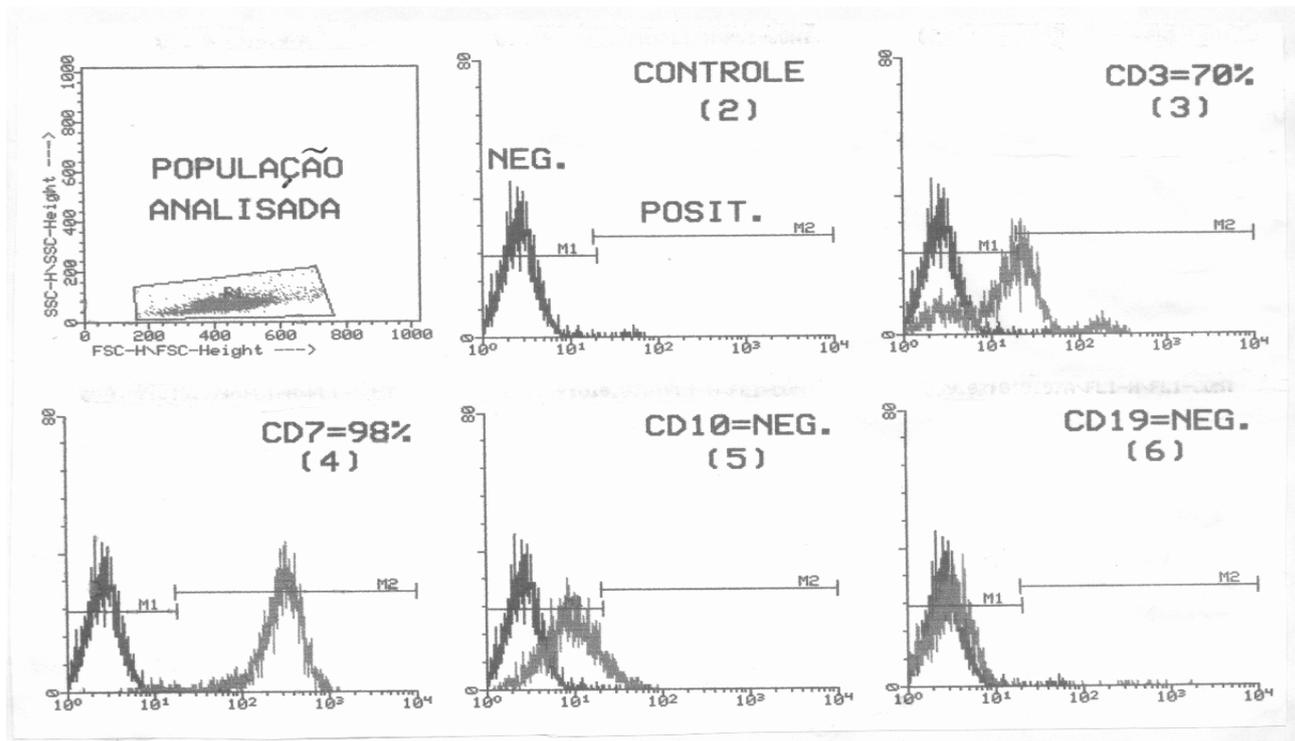


FIGURA 3: Padrão de Histogramas de Um Caso de LLA de Células T.

- (1) População analisada utilizando os parâmetros *Forward Scatter* e *Side Scatter*;
 (2) Controle isotópico negativo, perfil das células sem o AcMo; (3) CD3+= 70%;
 (4) CD7+= 98%; (5) CD10= 3%; (6) CD19= Negativo.

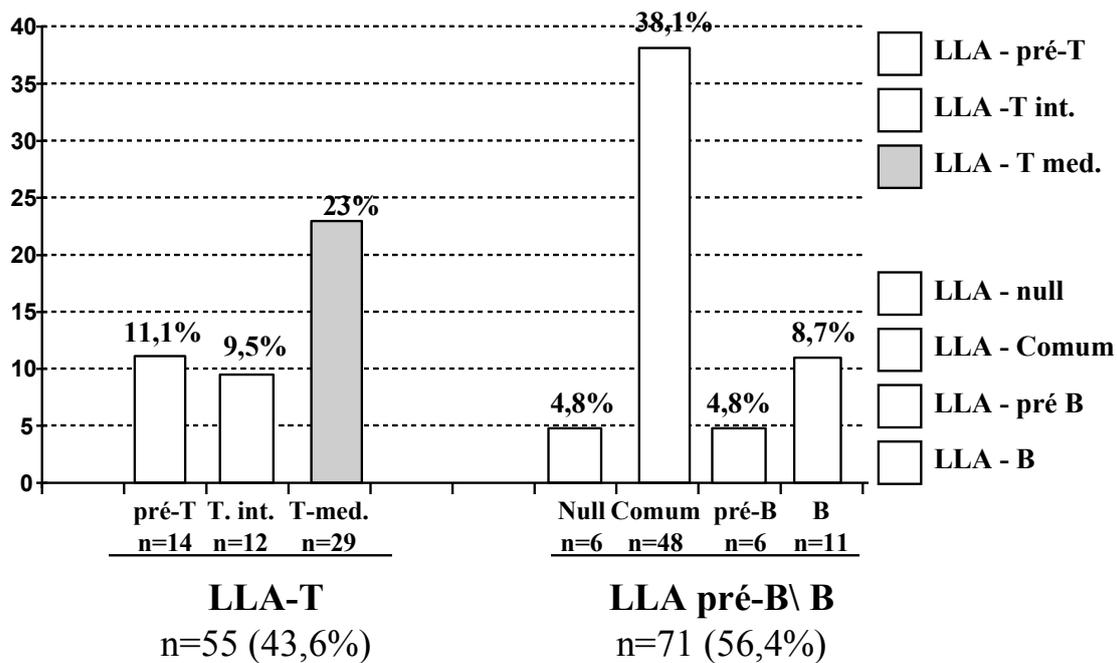


FIGURA 4: Classificação Imunológica das Leucemias Estudadas

Obs: **pré-T** (LLA pré-T), **T-int.** (LLA de células T intermediária), **T-med.** (LLA-T medular), **Null** (LLA-Null), **Comum** (LLA do tipo COMUM), **Pré-B** (LLA- pré B $\text{c}\mu^+$), **LLA-B** (LLA de células B).

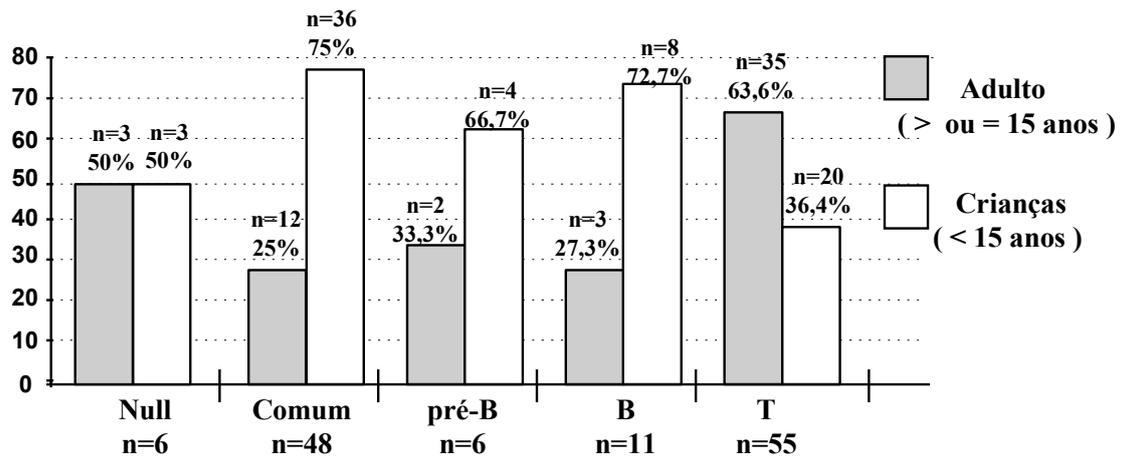


Figura 5: Distribuição das LLA de acordo com a faixa etária

Obs: **Null** (LLA do tipo Null), **Comum** (LLA do tipo COMUM), **pré-B** (LLA do tipo pré B), **B** (LLA de Células B), **T** (LLA de Células T).

TABELA 1:

Expressão de antígenos de diferenciação nas leucemias
linfóides agudas de células T

	<i>LLA-pré-T</i> n=14	<i>LLA-T-int</i> n=12	<i>T medular</i> n=29
Ac.Mo.	NT \ + (%)	NT \ + (%)	NT \ + (%)
CD1a	14 \ 00 (0)	12 \ 12 (100)	29 \ 00 (0)
CD2	14 \ 01 (7,1)	12 \ 12 (100)	29 \ 29 (100)
cCD3	14 \ 08 (57,1)	12 \ 12 (100)	29 \ 26 (89,7)
mCD3	14 \ 00 (0)	12 \ 00 (0)	29 \ 29 (100)
CD4	14 \ 00 (0)	12 \ 12 (100)	29 \ 18 (62,1)
CD7	14 \ 14 (100)	12 \ 12 (100)	29 \ 29 (100)
CD8	14 \ 00 (0)	12 \ 12 (100)	29 \ 13 (44,8)
CD10*	14 \ 02 (14,3)	12 \ 00 (0)	29 \ 15 (51,7)
CD34	14 \ 10 (71,4)	12 \ 08 (66,6)	29 \ 07 (24,1)
HLADR	14 \ 11 (78,6)	12 \ 09 (75,0)	29 \ 08 (27,6)
TdT	08 \ 07 (87,5)	11 \ 09 (81,8)	23 \ 11 (47,8)

Obs: **pré-T** (*LLA pré-T*), **T-int.** (*LLA de células T intermediária*), **T-med.** (*LLA-T medular*), **cCD3** (CD3 intracitoplasmática), **mCD3** (CD3 de membrana), **TdT** (Terminal Desoxinucleotidil Transferase), **NT** (Número de casos testados), **(+)** (Número de casos positivo), **(%)** (Percentual de casos positivos), **(*)** o antígeno CD10 pode ser encontrado em cerca de 10% dos casos de LLA de Células T ^(17, 22).

TABELA 2:

Expressão de antígenos de diferenciação nas leucemias linfoblásticas de linhagem B.

	<i>LLA-Null</i> n=6	<i>LLA-C</i> n=48	<i>LLA-(cμ+)</i> n=6	<i>LLA-B</i> n=11
AcMo	NT \ + (%)	NT \ + (%)	NT \ + (%)	NT \ + (%)
CD10	06 \ 00 (0)	48 \ 48 (100)	06 \ 06 (100)	11 \ 01 (9,1)
CD19	06 \ 06 (100)	48 \ 48 (100)	06 \ 06 (100)	11 \ 11 (100)
cCD22	06 \ 00 (0)	48 \ 32 (66,7)	06 \ 06 (100)	11 \ 11 (100)
mCD22	06 \ 00 (0)	48 \ 00 (0)	06 \ 06 (100)	11 \ 11 (100)
cμ	06 \ 00 (0)	48 \ 00 (0)	06 \ 06 (100)	(nr)
SmIg	06 \ 00 (0)	48 \ 00 (0)	06 \ 00 (0)	11 \ 11 (100)
Kappa	06 \ 00 (0)	48 \ 00 (0)	06 \ 00 (0)	11 \ 06 (54,5)
Lambda	06 \ 00 (0)	48 \ 00 (0)	06 \ 00 (0)	11 \ 05 (45,4)
CD34	06 \ 04 (66,6)	48 \ 17 (35,4)	06 \ 02 (33,3)	11 \ 00 (0)
HLADR	06 \ 05 (83,3)	48 \ 44 (91,7)	06 \ 06 (100)	11 \ 10 (90,9)

Obs: *LLA Null* (LLA do tipo null); *LLA-C* (LLA do tipo COMUM); *LLA cμ+* (LLA pré-B com expressão intracitoplasmática da cadeia pesada “mü” das imunoglobulinas); *LLA-B* (LLA de Células B); **cCD22** (CD22 intracitoplasmático), **mCD22** (CD22 de membrana), **cμ** (Cadeia pesada “mü” das imunoglobulinas intracitoplasmática), **SmIg** (Imunoglobulina de superfície). **nr** (Não realizado), **NT** (Número de casos testados), **(+)** (Número de casos positivos), **(%)** (Percentual de casos positivos).

TABELA 3:

Características Gerais dos Grupos Estudados.

	<i>LLA-Null</i> n=6	<i>LLA-C</i> n=48	<i>LLA- (cμ+)</i> n=6	<i>LLA-B</i> n=11	<i>LLA-T</i> n=55
Id. (me)	4-40 (15)	4-21(8)	1-25 (18)	4-21 (6)	2-63 (32)
Sexo (M)	5 (83,3%)	27 (56,2%)	4 (66,7%)	8 (72,7%)	39 (70,9%)
(F)	1 (16,7%)	21 (43,8%)	2 (33,3%)	3 (27,3%)	16 (29,1%)
L. x 10 ³ \mm ³	3,6 a 448,0	1,0 a 400,0	40,6 a 600,0	1,5 a 600,0	10,5 a 720,0
Bl.\SP% (Me)	60 a 100 (80)	10 a 100 (60)	20 a 100 (60)	20 a 100 (80)	10 a 100 (80)

Obs: **LLA Null** (LLA do tipo null); **LLA-C** (LLA do tipo COMUM); **LLA-cμ+** (LLA pré-B com expressão intracitoplasmática da cadeia pesada mü das imunoglobulinas); **LLA-B** (LLA de Células B), **LLA-T** (LLA de Células T); **Id** (Idade/anos); **M** (Sexo masculino); **F** (Sexo feminino); **L** (Leucometria no sangue periférico / mm³); **Bl.** (Contagem de células blásticas no sangue periférico); **Me** (mediana).

TABELA 4:

Correlação da classificação imunológica e colorações citoquímicas das leucemias estudadas

	<i>LLA-Null</i> n=6	<i>LLA-C</i> n=48	<i>LLA- (cμ+)</i> n=6	<i>LLA-B</i> n=11	<i>LLA-T</i> n=55
F. Ac. (+)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	46 (83,6%)
P.A.S. (+)	02 (33,3%)	10 (20,8%)	02 (33,3%)	00 (-)	19 (34,5%)
N.S. (+)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)

Obs: **LLA Null** (LLA do tipo null); **LLA-C** (LLA do tipo COMUM); **LLA-cμ+** (LLA pré-B com expressão intracitoplasmática da cadeia pesada mü das imunoglobulinas); **LLA-B** (LLA de Células B), **LLA-T** (LLA de Células T); **F.Ac.** (Fosfatase Ácida / Coloração Citoquímica); **PAS** (Ácido Periódico de Schiff / Coloração Citoquímica); **NS** (Negro de Sudan / Coloração Citoquímica), **Me** (mediana).

TABELA 5:

Correlação das Imunofenotipagens e Classificação FAB ⁽¹⁾ nas Leucemias Linfoblásticas Estudadas.

FAB	<i>LLA-Null</i> n=6	<i>LLA-C</i> n=48	<i>LLA-cμ+</i> n=6	<i>LLA-B</i> n=11	<i>LLA-T</i> n=55
LLA-L1	05 (83,3%)	30 (62,5%)	05 (83,3%)	00 (-)	17 (30,9%)
LLA-L2	01 (16,7%)	18 (37,5%)	01 (16,7%)	00 (-)	38 (69,1%)
LLA-L3	00 (-)	00 (-)	00 (-)	11 (100%)	00 (-)

Obs: *LLA Null* (LLA do tipo null); *LLA-C* (LLA do tipo COMUM); *LLA-cμ+* (LLA pré-B com expressão intracitoplasmática da cadeia pesada mü das imunoglobulinas); *LLA-B* (LLA de Células B), *LLA-T* (LLA de Células T); **L1 ,L2 e L3** (Leucemia linfóide aguda: tipo L1, L2 e L3, classificação morfológica das leucemias linfóides agudas, segundo os critérios do grupo French American British- FAB ⁽¹⁾).

TABELA 6:

Correlação das Imunofenotipagens e Aspecto Clínico Tumoral das Leucemias Linfoblásticas Estudadas.

	<i>LLA-Null</i> n=6	<i>LLA-C</i> n=48	<i>LLA-cμ+</i> n=6	<i>LLA-B</i> n=11	<i>LLA-T</i> n=55
Linfaden.	04 (66,6%)	25 (52,1%)	03 (50,0%)	09 (81,8%)	30 (54,5%)
Esplen.	03 (50,0%)	24 (50,0%)	04 (66,7%)	11 (90,9%)	31 (56,4%)
Hepat.	03 (50,0%)	20 (41,7%)	04 (66,7%)	04 (36,4%)	27 (49,1%)
M. Abd.	00 (-)	00 (-)	00 (-)	10 (90,9%)	01 (1,8%)
M.Med.	00 (-)	00 (-)	00 (-)	00 (-)	31 (56,4%)
Env.SNC.	00 (-)	08 (16,7%)	00 (-)	02 (18,2%)	11 (20,0%)

Obs: **Linfaden.** (Linfadenopatia Generalizada); **Esplen.** (Esplenomegalia); **Hepat.** (hepatomegalia); **M. Med.** (Massa Mediastinal); **M. Abd.** (Massa Abdominal); **Env. SNC.** (Envolvimento do Sistema Nervoso Central), *LLA Null* (*LLA do tipo null*); *LLA-C* (*LLA do tipo COMUM*); *LLA-cμ+* (*LLA pré-B com expressão intracitoplasmática da cadeia pesada mü das imunoglobulinas*); *LLA-B* (*LLA de Células B*), *LLA-T* (*LLA de Células T*).

TABELA 7:
Correlação da Leucometria e Classificação Imunológica das Leucemias
Linfoblásticas de linhagem B e T

Leucometria (x 10 ³ \ mm ³)	<i>LLA-Null</i> n=6	<i>LLA-C</i> n=48	<i>LLA-cμ+</i> n=6	<i>LLA-B</i> n=11	<i>LLA-T</i> n=55
< 5,0	01 (16,7%)	04 (8,3%)	01 (16,7%)	02 (18,2%)	00 (-)
5,0 a 10,0	00 (-)	11 (22,9%)	00 (-)	02 (18,2%)	09 (16,4%)
10,0 a 50,0	03 (50,0%)	12 (25,0%)	03 (50,0%)	04 (36,3%)	12 (21,8%)
50,0 a 100,0	02 (33,3%)	09 (18,8%)	00 (-)	01 (9,1%)	14 (25,4%)
> 100,0	00 (-)	12 (25,0%)	02 (33,3%)	02 (18,2%)	20 (36,4%)

Obs: **LLA Null** (LLA do tipo null); **LLA-C** (LLA do tipo COMUM); **LLA-cμ+** (LLA pré-B com expressão intracitoplasmática da cadeia pesada mü das imunoglobulinas); **LLA-B** (LLA de Células B), **LLA-T** (LLA de Células T).

TABELA 8:

Correlação da Classificação Imunológica das Leucemias e Percentual de Células Blásticas no Sangue Periférico.

% Blastos (SP)	<i>LLA-Null</i> n=6	<i>LLA-C</i> n=48	<i>LLA-cμ+</i> n=6	<i>LLA-B</i> n=11	<i>LLA-T</i> n=55
10 a 20	00 (-)	06 (12,5%)	01 (16,7%)	01 (9,1%)	04 (7,3%)
21 a 30	00 (-)	02 (4,2%)	01 (16,7%)	01 (9,1%)	04 (7,3%)
31 a 60	02 (33,3%)	05 (10,4%)	02 (33,3%)	04 (36,4%)	11 (20,0%)
61 a 100	04 (66,7%)	35 (72,9%)	02 (33,3%)	05 (45,4%)	36 (65,4%)

Obs: **LLA Null** (LLA do tipo null); **LLA-C** (LLA do tipo COMUM); **LLA-cμ+** (LLA pré-B com expressão intracitoplasmática da cadeia pesada mü das imunoglobulinas); **LLA-B** (LLA de Células B), **LLA-T** (LLA de Células T).

OCORRÊNCIA DE *CRYPTOSPORIDIUM* SP EM FEZES DIARRÉICAS DE CRIANÇAS DO MUNICÍPIO DE MARINGÁ PR

OCURRENCE OF *CRYPTOSPORIDIUM* SP IN DIARRHEIC FECES OF CHILDREN LIVING IN MARINGÁ PR

Maria da Luz R. Moitinho¹, Andrea Cláudia B. S. Roberto¹, Maria do Rosário Martins²

RESUMO — Com o objetivo de se investigar a frequência de infecção por *Cryptosporidium* sp examinaram-se 136 amostras de fezes diarréicas de crianças, com idade de zero a 12 anos, internadas no Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM) e encaminhadas ao Núcleo Integrado de Saúde III (NIS III). Oocistos de *Cryptosporidium* sp foram encontrados em 9 (6,6%) amostras fecais, após prévia concentração do material pela técnica de sedimentação em formol-éter e posterior coloração dos esfregaços pela carbol fucsina associada ao dimetilsulfóxido. Prevalências maiores de infecção por *Cryptosporidium* sp foram observadas entre as crianças de faixa etária igual ou superior a 1 ano e inferior a 2 anos de idade. Ovos de helmintos ou cistos de protozoários pesquisados através da técnica de sedimentação em formol-éter foram detectados em 16,2% das amostras. Nenhuma das amostras positivas para *Cryptosporidium* sp foi positiva para outros protozoários ou helmintos intestinais. Vale ressaltar que a exceção da espécie *Giardia duodenalis*, cuja prevalência foi de 10,3%, a ocorrência de *Cryptosporidium* sp foi superior (6,6%) a observada para outros protozoários ou helmintos intestinais.

PALAVRAS CHAVE — *Cryptosporidium* sp, criptosporidiose, parasitas intestinais.

¹ -Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá

² -Hospital Universitário Regional de Maringá

SUMMARY — With the objective of researching the frequency of *Cryptosporidium* infection, 136 diarrheic feces samples from children aged zero to 12 years, attended at the Hospital Universitario Regional de Maringá (HURM) and at the Núcleo Integrado de Saúde (NIS III) were examined. *Cryptosporidium* oocysts were detected in 9 (6.6%) fecal samples, after concentration of the material by formol-ether sedimentation and subsequent staining of the smears by dimethyl sulfoxide-carbol fuchsin. Prevalence rates of *Cryptosporidium* infection were highest in those children aged equal or above 1 year and below 2 years. Helminth eggs or protozoan cysts researched by formol-ether sedimentation technique were detected in 16.2% of the fecal samples. None of the positive samples for *Cryptosporidium* was positive for other protozoa or intestinal helminths. Except for *Giardia duodenalis*, whose prevalence was 10.3%, the occurrence of *Cryptosporidium* was superior (6.6%) to that found for other protozoa or intestinal helminths.

Key words — *Cryptosporidium* sp, cryptosporidiosis, intestinal parasites.

INTRODUÇÃO

Cryptosporidium sp, protozoário pertencente ao filo Apicomplexa, classe Esporozoa e sub-classe Coccídia, foi observado pela primeira vez, em 1907, por Tyzzer em corte histológico de mucosa gástrica de camundongo de laboratório. A partir desta data infecções por *Cryptosporidium* sp foram descritas em répteis, aves e mamíferos.

Os primeiros casos de criptosporidiose humana foram reportados em 1976, mas relativamente poucos casos foram subseqüentemente diagnosticados até que esse coccídio foi incriminado como agente causador de infecção grave em pacientes com a Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (AIDS). Nesses pacientes a infecção determina quadros de diarréia prolongada, com numerosas evacuações diárias, podendo levar a óbito grande parte dos pacientes (Fayer e Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995).

Atualmente, os estudos tem mostrado que a infecção por este coccídio ocorre com relativa frequência em indivíduos imunocompetentes, especialmente em crianças menores de 5 anos, originando quadros agudos de diarréia, na maioria das vezes, de resolução espontânea (Fayer e Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995).

Os índices relativamente altos de parasitismo por *Cryptosporidium* sp observados no Brasil (Guizelini, 1991; Mangini *et al.*, 1992; Silva, *et al.*, 1994) e no estrangeiro (Adegbola, *et al.*, 1994) chamam a atenção para a importância desse coccídio como um dos possíveis agentes etiológicos de diarréia tanto em indivíduos imunocompetentes como em imunodeficientes.

O diagnóstico laboratorial da criptosporidiose é usualmente feito através da identificação de oocistos nas fezes. Os exames parasitológicos de fezes realizados através

das técnicas habituais dificilmente revelam os oocistos de *Cryptosporidium* sp. A pesquisa de *Cryptosporidium* sp exige, frequentemente, a concentração prévia do material fecal por técnicas de flutuação (Sheater, 1923) ou de sedimentação (Ritchie, 1948) e o uso de procedimentos de coloração tais como os derivados da técnica de Ziehl-Neelsen, o da auramina-fucsina e o da safranina-azul de metileno, entre outros, (Fayer e Ungar, 1986; O'Donoghue, 1995).

Busca-se através do presente trabalho verificar a ocorrência de *Cryptosporidium* sp em fezes diarréicas de crianças de zero a 12 anos, tendo em vista a falta de dados sobre a infecção em nosso meio.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras fecais: Em recipientes plásticos contendo solução tamponada de formalina a 10% foram coletadas amostras de fezes diarréicas de **a)** crianças internadas no Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM), período de abril de 1993 a junho de 1996 e de **b)** crianças encaminhadas ao Núcleo Integrado de Saúde III (NIS III), período de fevereiro de 1995 a março de 1997.

Métodos para detecção de Cryptosporidium sp e de outros parasitas intestinais: A pesquisa de oocistos de *Cryptosporidium* sp foi realizada através de concentração prévia das amostras de fezes pela técnica de sedimentação em formol-éter (Ritchie, 1948) e posterior coloração dos esfregaços pela carbol fucsina associada ao dimetilsulfóxido (Pohjola *et al.*, 1984). Os demais parasitas foram pesquisados pela técnica de sedimentação em formol-éter segundo Ritchie.

RESULTADOS

Ao todo foram examinadas 136 amostras de fezes diarréicas, sendo 52 provenientes de crianças internadas no Hospital Universitário Regional de Maringá e 84 provenientes do Núcleo Integrado de Saúde III. Oocistos de *Cryptosporidium* sp foram detectados em 6,6% das amostras analisadas, sendo similares os índices de prevalência encontrados nas amostras fecais pertencentes aos dois grupos estudados (Tabela 1).

A frequência de oocistos de *Cryptosporidium* sp em ambos os grupos estudados associada a faixa etária é mostrada na tabela 2. Prevalências maiores foram observadas entre as crianças de faixa etária igual ou superior a 1 ano e inferior a 2 anos de idade.

A prevalência de outros protozoários e de helmintos intestinais segundo a procedência das amostras fecais é mostrada na tabela 3. Ovos de helmintos ou cistos de protozoários foram detectados em 16,2% das amostras, sendo a espécie *Giardia duodenalis* a mais prevalente entre as crianças, cujo índice de positividade foi de 10,3%. Nenhuma das amostras positivas para *Cryptosporidium* sp foi positiva para outros protozoários ou helmintos intestinais.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

O presente estudo, o primeiro sobre a criptosporidiose no município de Maringá-PR, revelou índice de positividade igual a 6,6% entre as amostras de fezes diarréicas

provenientes do Hospital Universitário Regional de Maringá e do Núcleo Integrado de Saúde III (Tabela 1).

Os casos de criptosporidiose diagnosticados pelo presente trabalho ocorreram quase que exclusivamente em crianças com menos de 2 anos de idade (Tabela 2). Prevalências maiores em crianças de menor faixa etária também foram observadas por Mangini *et al.*, 1992; Silva e Hirschfeld, 1994; Adegbola *et al.*, 1994 e Gennari-Cardoso *et al.*, 1996. Segundo a literatura, crianças com idade inferior a 5 anos parecem ser mais suscetíveis a infecção presumivelmente devido a sua imaturidade imunológica e ao seu maior risco de infecção em função dos precários hábitos higiênicos (O'Donoghue, 1995).

Índices similares ao registrado pelo presente trabalho (6,6%) foram encontrados por Loureiro *et al.*, 1989, em Belem-PA (5,2%); Silva *et al.*, 1994, em Recife-PE (6,4%) e Gennari-Cardoso *et al.*, 1996, em Uberlândia-MG (4,26%), embora os dois primeiros autores tenham restringido seus estudos, respectivamente, a crianças entre a faixa etária de um a dois anos e menores de um ano de idade.

Índices superiores de infecção por *Cryptosporidium* sp foram observados em São Paulo-SP por Guizelini, 1991 (12,1%) e Mangini *et al.*, 1992 (17,4%) e, em Recife-PE, por Alves *et al.*, 1989 (21,3%). Vale ressaltar que as amostras fecais diarréicas incluídas nos experimentos dos autores acima referidos eram provenientes respectivamente de crianças de zero a 12 anos, de zero a 4 anos e de crianças portadoras de desnutrição grave.

Prevalências menores de infecção por *Cryptosporidium* sp foram observadas por Silva e Hirschfeld, 1994, em Alfenas-MG (2,6%) e por Osaki *et al.*, 1995, em Londrina-PR (0,2%). A inclusão de amostras de fezes de adultos por ambos os autores e o fato do

trabalho de Londrina ter sido feito com amostras de fezes não diarréicas podem estar associados aos baixos índices de prevalência encontrados.

Com relação aos outros protozoários ou helmintos intestinais ressalta-se que a exceção da espécie *G. duodenalis*, cuja prevalência foi de 10,3%, a ocorrência de *Cryptosporidium* sp entre as amostras fecais examinadas foi mais elevada (6,6%) do que a observada para *Entamoeba coli* (1,5%), *Endolimax nana* (1,5%), *Ascaris lumbricoides* (1,5%), ancilostomídeos (0,7%), *Trichuris trichiura* (1,5%), *Strongyloides stercoralis* (0,7%) e *Hymenolepis nana* (1,5%).

Embora alguns trabalhos apontem a frequente associação dos protozoários *G. duodenalis* e *Cryptosporidium* sp (Jokipii *et al.* e Wolfson *et al.* *apud* Silva e Hirschfeld, 1994) nenhuma das amostras positivas para *Cryptosporidium* sp analisadas pelo presente trabalho foi concomitantemente positiva para outros protozoários ou helmintos intestinais.

Conforme pode ser observado, os resultados de investigação de prevalência de *Cryptosporidium* sp são variáveis. As diferenças observadas podem não estar somente associadas a heterogeneidade das populações examinadas no que se refere a variáveis tais como condições sócio-econômicas, faixa etária, estado nutricional, entre outras, mas também podem ser decorrentes das diferentes técnicas de diagnóstico utilizadas. De qualquer forma fica, no entanto, evidente que os índices de prevalência de infecção por *Cryptosporidium* sp observados no Brasil ou no estrangeiro são expressivos, o que implica em se reconhecer que o referido protozoário deva ser rotineiramente investigado em amostras de fezes diarréicas, especialmente daquelas provenientes de crianças com idade inferior a 5 anos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEGBOLA, R. A.; DEMBA, E.; DE VEER, G. TODD, J. *Cryptosporidium* infection in Gambia children less than 5 years of age. *J. Trop. Med. Hyg.*, 97: 103-107, 1994.
- ALVES, J.G.B.; MONTENEGRO, F.; REGALATO, I. Criptosporidiose em crianças com desnutrição grave. *J.Pediatr* ,65: 220-222, 1989.
- FAYER, R.; UNGAR, B.L.P. *Cryptosporidium* spp. and Cryptosporidiosis. *Microbiol. Reviews.*, 50(4): 458-483, 1986.
- GENNARI-CARDOSO, M.L.; COSTA-CRUZ, J..M.; CASTRO, E.; LIMA, L M.; PRUDENTE, D. V. *Cryptosporidium* sp. in children suffering from acute diarrhea at Uberlandia city, State of Minas Gerais, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 91(5): 551-554, 1996.
- GUIZELINI, E. *Pesquisa de oocistos de Cryptosporidium sp nas fezes de pacientes com diarréia, mediante emprego de 3 técnicas de coloração*. São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo 67p,1991. (Dissertação de mestrado).
- LOUREIRO, E.C.B.; LINHARES, A.C.; MATA, L. Criptosporidiose em crianças de 1 a 2 anos de idade, com diarréia aguda em Belém, Pará, Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84: 117-122, 1989.
- MANGINI, A.C.; DIAS, R.M.D.S.; GRISI,S.J.F.E.; ESCOBAR, A.M.U.; TORRES, D.M.A.G.V.; ZUBA, I.P.R.; QUADROS, C.M.S.; CHIEFFI, P.P. Parasitismo por *Cryptosporidium* sp em crianças com diarréia aguda. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 34(4): 341-345, 1992.

- O'DONOGHUE, P.J. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis in man and animals. *International Journal for Parasitology*, 25(2), 1995.
- OSAKI, S.C.; SOUZA, C.F.; NAVARRO, I.T.; BARROS, M.A.F.; MENEZES, M.C.N.D.; FREIRE, R.L. *Cryptosporidium* sp em população rural e urbana na região de Londrina-Paraná. In: *Anais do Encontro Anual de Iniciação Científica*, UEM, Maringá, p.501, 1995.
- POHJOLA, S.; JOKIPII, L.; JOKIPII, A. Dymethylsulfoxide-Ziehl-Neelsen technique for detection of cryptosporidial oocysts. *Veterinary Record* 115: 442-443, 1984.
- RITCHIE, L.S. An ether sedimentation technique for routine stool examination. *Bull. U.S. Army Med. Dept.* 8: 326, 1948.
- SHEATER, A.L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by floatation technique. *J. Comp. Pathol. Ther.* 36: 266-275, 1923.
- SILVA, A. C.; HIRSCHFELD, M.P.M. Ocorrência de *Cryptosporidium* sp, em indivíduos com fezes diarréicas no município de Alfenas, MG. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo*, 30(1):33-37, 1994.
- SILVA, G.A.P.; MAGALHÃES, M.; OLIVEIRA, A.M.A.; MELO, V.M. Diarréia aguda do lactente associada ao *Cryptosporidium* sp. na cidade de Recife. *J. Pediatr* 70: 44-47, 1994.

Tabela 1. Frequência de *Cryptosporidium* sp. em amostras de fezes diarréicas provenientes do Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM) e do Núcleo Integrado de Saúde III (NIS III), no município de Maringá-PR.

Origem	Amostras examinadas		Amostras positivas	
	(N°)	(N°)	(%)	
HURM	52	03	5,8	
NIS III	84	06	7,1	
Total	136	09	6,6	

Tabela 2. Frequência de *Cryptosporidium* sp em amostras de fezes diarréicas provenientes do Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM) e do Núcleo Integrado de Saúde III (NIS III), no município de Maringá-PR, conforme a idade.

Idade (anos)	HURM			NIS III		
	Amostras			Amostras		
	examinadas (N ^o)	positivas (N ^o)	(%)	examinadas (N ^o)	positivas (N ^o)	(%)
> 0 e < 1	31	02	6,5	04	00	0,0
≥ 1 e < 2	09	01	11,1	20	04	20,0
≥ 2 e < 3	04	00	0,0	08	00	0,0
≥ 3 e < 4	01	00	0,0	12	01	8,3
≥ 4 e ≤ 12	03	00	0,0	37	01	2,7
Desconhecida	04	00	0,0	03	00	0,0
Total	52	03	5,8	84	06	7,1

Tabela 3. Frequência de outros protozoários e de helmintos em amostras de fezes diarreicas provenientes do Hospital Universitário Regional de Maringá (HURM) e do Núcleo Integrado de Saúde III (NIS III), no município de Maringá-PR.

Origem	Amostras	Amostras	Prevalência (%)							
	examinadas	positivas	Protozoários			Helmintos				
	(N ^o)	(%)	GD	EC	EN	AL	AN	TT	SS	HN
HURM	52	11,5	7,7	0,0	1,9	1,9	0,0	0,0	0,0	0,0
NIS III	84	19,0	11,9	2,4	1,2	1,2	1,2	2,4	1,2	2,4
Total	136	16,2	10,3	1,5	1,5	1,5	0,7	1,5	0,7	1,5

GD: *Giardia duodenalis*; EC: *Entamoeba coli*; EN: *Endolimax nana*; AL: *Ascaris lumbricoides*; AN: Ancilostomídeos; TT: *Trichuris trichiura*; SS: *Strongyloides stercoralis*; HN: *Hymenolepis nana*.

PREVALÊNCIA DAS ENTEROPARASIToses NAS VILAS PERIFÉRICAS DA GRANDE PORTO ALEGRE, NOS ASSENTAMENTOS DE TRABALHADORES RURAIS E NA CIDADE DE ARROIO DOS RATOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Survey of intestinal parasites among school students inhabitants of Porto Alegre Metropolitan area and among rural communities of Rio Grande do Sul State

Geraldo A. De Carli¹, Marcia Mentz², Marilise B. Rott², Ana C.A. da Silva¹, Aline Wendorff¹, Tiana Tasca¹, Daniela S. Castilhos¹, Luciane Hypolito¹, Luciana Mylius¹, Rosana Montenegro¹ e Germano De Carli¹

RESUMO - Realizou-se um trabalho integrado de pesquisa e extensão comunitária, com o objetivo de avaliar a prevalência das enteroparasitoses e das condições sócioeconômicas e sanitárias da população residente em 33 vilas periféricas da região metropolitana de Porto Alegre, em 3 assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos no Estado do Rio Grande do Sul. Esse estudo foi realizado durante o período de 1965 a 1996 em 17.951 pessoas, pertencentes a um grupo etário de zero a 15 anos, todos alunos das escolas públicas, e em mais dois grupos etários: um de 16 a 20 anos, e outro, com mais de 20 anos.. As amostras fecais foram examinadas pela técnica de Hoffman, Pons e Janer. Das pessoas examinadas, 66,0% (11.855) estavam infectados por uma ou mais espécies de parasitos intestinais, dos quais 31,0% (5.581) apresentaram apenas uma espécie de parasito, enquanto que o poliparasitismo representou 35,0% das respostas, em um total de 6.277 combinações. O maior percentual geral de infecção obtido para nematóides e cestóides foi de 43,1% (7.092) para *Trichuris trichiura* e, entre os protozoários, a *Giardia lamblia* com 17,1% (2.820). As associações mais freqüentes, em infecções concomitantes por helmintos e protozoários, foram: *Ascaris lumbricoides* e *T. trichiura* com 29,2% (1.835), *T. trichiura* e *G. lamblia*, com 8,5% (537) e *Entamoeba coli* e *G. lamblia*, com 2,0% (124). Os resultados obtidos nesse inquérito levam a sugerir a necessidade de proporcionar às pessoas residentes na vilas periféricas, nos assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos uma campanha de educação sanitária e, paralelamente, o desenvolvimento de medidas administrativas, visando ao saneamento básico.

PALAVRAS-CHAVE - Enteroparasitos, prevalência, escolares, trabalhadores rurais.

¹ Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia e ² Departamento de Microbiologia, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.

SUMMARY - An integrated programme of intestinal parasite control was performed between 1965 and 1996, in primary school children, and middle school students inhabitants the metropolitan area of Porto Alegre, in three rural communities of Charqueadas, Capela de Santana, and Fazenda de São Pedro and in the Arroio dos Ratos city. In order to determine the prevalence rate of intestinal parasites in this population a total of 17.951 stools specimens were collected. The samples were examined by Hoffman, Pons & Janer. *Trichuris trichiura* (43,1%) and *Giardia lamblia* (17,1%) were the predominant intestinal parasites in the present survey.

KEY WORDS - Intestinal parasites, rural communities, survey, integrated programma.

INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias continuam sendo uma significante causa de morbidade e mortalidade no mundo, particularmente nos países subdesenvolvidos, tropicais e subtropicais.

Na zona metropolitana das grandes cidades de países em desenvolvimento a população estudantil é geralmente mais sadia com hábitos de higiene estabelecidos. Entretanto, entre a modernização e em bairros com edificios majestosos, existem pequenas áreas onde vivem aglomerados de pessoas marginalizadas das condições mínimas de qualidade de vida. Nessas favelas, compostas por conjuntos de casebres, usualmente com baixas medidas sanitárias, com o meio ambiente poluído, vivem pessoas doentes, especialmente crianças e adultos jovens. Algumas favelas estão situadas nas proximidades dos depósitos de lixo, enquanto outras, perto dos limites do esgoto.

A transmissão dos geohelminthos está diretamente relacionada com as condições de vida e de higiene das comunidades urbanas e rurais.^{1,2,3,4,5,10} Os parasitos apresentam uma alta prevalência entre a população de baixo nível sócioeconômico, onde os padrões de vida, de higiene ambiental, de educação sanitária e de outras normas básicas para a proteção da saúde são inadequadas e deficientes. Nas zonas rurais, as crianças são as que estão mais expostas às infecções, porque seus hábitos e suas atividades carecem de higiene pessoal.

Na transmissão das infecções por geohelminthos, é essencial que o solo esteja contaminado com material fecal. A maior prevalência de parasitos intestinais entre as crianças das zonas periféricas não reflete nenhuma predisposição racial, genética ou uma suscetibilidade à infecção, mas uma diferença na educação, na cultura e nos hábitos alimentares, os quais podem afetar a exposição à infecção.

A disciplina de Análises Parasitológicas da Faculdade da Farmácia, UFRGS, visando criar nos alunos uma mentalidade voltada aos hábitos de saúde, para o diagnóstico das enteroparasitoses e integrá-los a uma equipe multidisciplinar de saúde, vem realizando durante os últimos vinte e cinco anos trabalhos de pesquisa e extensão comunitária junto às populações carentes do Estado.

O objetivo desse estudo foi estabelecer a prevalência de enteroparasitos nas populações residentes nas vilas periféricas da Grande Porto Alegre, entre os trabalhadores

rurais nos assentamentos de Charqueadas, Capela de Santana e Fazenda de São Pedro e entre escolares da cidade de Arroio dos Ratos, no Estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Áreas Estudadas:

Vilas periféricas metropolitanas: Durante o período de 1965 a 1981, foram estudadas 33 vilas periféricas localizadas na Grande Porto Alegre. Essas vilas estão localizadas a uma altitude de aproximadamente 10 m, apresentando clima temperado tipo subtropical, com inverno úmido, muitas chuvas, precipitação pluviométrica de 1.267 mm, temperatura média máxima de 24,5°C. O solo é arenoso e argilo-arenoso. As vilas foram contruídas por diversos planejadores, não seguindo as mesmas regras de urbanização. A maioria dessas vilas foram implantadas fora do perímetro urbano, sendo habitadas por uma população heterogênea. As casas não são padronizadas, possuindo um ou dois dormitórios, cozinha, sala e sanitário. A grande maioria das residências possui as latrinas fora das casas. Em algumas vilas, as casas são servidas pela rede de água, enquanto que outras têm poço próprio, bomba d'água, cisterna ou reservatório. O lixo, em raras vilas, é removido diariamente, através de coleta pública. Em outras, ele é queimado ou deixado exposto em monturos sobre o solo. As ruas não são pavimentadas e nem calçadas. A arborização foi observada em poucas vilas. Também as casas não apresentavam jardins, e muito poucas possuíam horta. A população, de maneira geral, é constituída por funcionários públicos, mecânicos, motoristas, domésticas, pintores, pedreiros, comerciários, estudantes e crianças. Esse estudo foi realizado em uma população de 16.460 pessoas, pertencentes a um grupo etário de zero a 15 anos, todos alunos das escolas públicas. As enteroparasitoses foram estudadas em mais dois grupos etários: um de 16 a 20 anos, e outro, com mais de 20 anos. Quanto à cor, a população é formada por brancos, pretos e mulatos de ambos os sexos. As vilas estudadas foram: MAPA, Nossa Senhora de Fátima, Dona Teodora, Santa Rosa, Santo Agostinho, Santa Luzia, Restinga, Maria da Conceição, Santana, São José do Murialdo, Cruzeiro do Sul, São Gabriel, Pinto, Santa Cecília, Brasília, Assunção, 1º de Março, Cipó, Frei Caneca, Agronomia, São Borja, Leão, Passo das Pedras, São Sepé Tiaraju, Cristal, Sarandi, São Francisco, Ipiranga, Lomba do Pinheiro, Alegre, União, Central, Miriam e Celis, todas localizadas na Grande Porto Alegre.

Assentamentos de trabalhadores rurais. Durante os anos de 1994 e 1995, foram escolhidos três assentamentos de trabalhadores rurais, Charqueadas, Capela de Santana e Fazenda São Pedro, para o estudo da prevalência das enteroparasitose. Esses assentamentos estão localizados próximo à area metropolitana da Grande Porto Alegre, apresentando clima temperado tipo subtropical, com inverno úmido e muitas chuvas. Os assentados de Charqueadas e Fazenda de São Pedro, depois de vários anos de ocupação, possuem casas de madeira, enquanto que, em Capela de Santana, a grande maioria ainda vive em barracos cobertos por plástico preto e uma minoria habita casas de madeira e de alvenaria deixadas nos assentamentos pelos antigos proprietários. A população desses assentamentos é constituída por agricultores procedentes de diferentes regiões do Estado do Rio Grande do Sul. Esses assentados são oriundos de Nonoai, Linha Bonita, Trindade do Sul, Bagé, São Miguel das Missões, Jaguari, Sarandi, Ronda Alta, Passo Fundo. Alpestre, Erechim, Rodeio Bonito,

Frederico Westphalen, São João da Urtiga, Seberi, Salto do Jacuí, Rondinha, Guarujá do Sul, Severino de Almeida, Francisco Beltrão, Aratiba, Liberato Salzano e Tapejara. A população estudada é composta por 305 pessoas pertencentes a um grupo etário de zero a 70 anos. Esses trabalhadores rurais estão acampados há aproximadamente 5 anos, vivendo em péssimas condições de saúde e de habitação. As crianças freqüentam escolas da rede municipal.

Cidade de Arroio dos Ratos: A sede municipal de Arroio dos Ratos, enquadrada na área Metropolitana de Porto Alegre, situa-se junto à BR-290, estrada federal que liga Porto Alegre a Uruguaiana e a toda a fronteira, distando 54 km da Capital do Estado. Esse é o ponto e o centro de ligação entre as cidades de Butiá, São Jerônimo e Charqueadas, permitindo o acesso para toda a região do Alto Taquari, através de São Jerônimo e Triunfo. O município de Arroio dos Ratos pertence à micro região homogênea do vale do Jacuí. A cidade de Arroio dos Ratos está localizada na depressão central, sendo uma depressão periférica, entre o escudo cristalino e o planalto, cortado pelo rio Jacuí. Encontra-se a 51°44' Long.W.Gr e a 30°05' Lat. Sul. O clima é subtropical, com invernos frescos e ocorrências de geadas. Verões quentes, cuja média do mês mais quente é superior a 22°C. As chuvas são bem distribuídas durante o ano. Arroio dos Ratos limita-se ao norte, oeste e sul com o município de São Jerônimo e ao leste com o município de Guaíba. Com o declínio e a extinção da indústria carbonífera em Arroio dos Ratos, sua população sofreu um decréscimo acentuado pelo êxodo de operários da indústria carbonífera. Atualmente a população é composta pelas mais variadas etnias, as quais vivem na sede do município, na zona rural e na zona periférica. A população estudantil dessa cidade é de aproximadamente 2.500 alunos, entretanto, esse estudo preliminar foi realizado em 1.186 escolares, pertencentes a um grupo etário de 3 a 16 anos, todos alunos das escolas públicas municipais e estaduais, situadas nas diferentes zonas do município

Coleta da amostra: Na primeira visita às vilas, aos assentamentos e a cidade de Arroio dos Ratos, após a motivação das crianças e dos adultos sobre os problemas de higiene e educação sanitária, através de palestras e filmes, foram distribuídos recipientes de plástico com tampa, para a coleta das fezes e preenchidas fichas do inquérito coproparasitológico..

Exame coprológico: O procedimento usado para o exame parasitológico das fezes foi: a técnica da sedimentação, espontânea (Hoffman, Pons & Janer, 1934)^{7,8}. Foi examinada uma amostra de cada pessoa dentro de um período de 12 horas após a coleta. Devido as dificuldades impostas pelos estudantes, adultos e colonos, não foi possível realizar o método da fita de celofane adesiva e transparente para a pesquisa de ovos de *Enterobius vermicularis* em toda a população estudada.

RESULTADOS

Pelos dados observados das 17.951 amostras examinadas, 66,0% (11.855) apresentaram resultados positivos e 34,0% (6.096) foram negativas para parasitos intestinais. (Tabela 1). A análise dos resultados mostrou que nas vilas periféricas o índice de infecção foi de 68,9% (11.341), enquanto que nos assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos a prevalência foi igual 49,5% (151) e 30,6% (363), respectivamente (Tabela 1). A Tabela 2 expressa a distribuição específica dos enteroparasitos, sendo que o maior percentual geral obtido nas vilas periféricas para protozoários foi de 17,1% (2.820) para

Giardia lamblia e, entre os nematóides e cestóides foi de 43,1% (7.092) para *Trichuris trichiura*. Nos assentamentos de trabalhadores rurais, os índices de infecção para protozoários foram de 15,1% (46) para *G. lamblia* e 15,7 % (48) para *Entamoeba coli* e 9,5% (29) para Ancilostomídeos. Na cidade de Arroio dos Ratos, a maior prevalência de parasitos intestinais foi de 8,9% (105) para *G. lamblia* e 11,9% (141) para *Ascaris lumbricoides*. A Tabela 3 mostra as associações dos parasitos mais frequentes em infecções concomitantes por helmintos e protozoários e permite verificar que as combinações mais constantes foram: *A. lumbricoides* e *T. trichiura* com 29,2% (1.835), *T. trichiura* e *G. lamblia* com 8,5% (537), *E. coli* e *G. lamblia* com 2,0% (124), em um total de 6.277 combinações.

Vilas periféricas da Grande Porto Alegre: A Vila Mapa, com 78,2% (980), e a Vila Restinga Velha, com 85,5% (894) foram os núcleos habitacionais que apresentaram os maiores índices de infecção. Pelos dados observados na Tabela 1, das 16.460 pessoas pesquisadas, 68,9% (11.341) foram positivos e 31,1% (5.119), negativos para enteroparasitos. O poliparasitismo apresentou 37,4% (6.148) das respostas. A Tabela 2 expressa a distribuição específica dos parasitos na população examinada, sendo o maior percentual geral obtido para nematóides e cestóides foi de 43,1% (7.092) para *T. trichiura* e, entre os protozoários, a *G. lamblia* com 17,1% (2.820). As associações dos parasitos mais frequentes em infecções concomitantes por helmintos e protozoários foram *A. lumbricoides* e *T. trichiura* com 29,9% (1.835), *T. trichiura* e *G. lamblia* com 8,7% (537) e, *E. coli* e *G. lamblia* com 2,0% (124), em um total de 6.148 combinações. Foi verificado que a prevalência das helmintoses e das protozooses na faixa de zero a 5 anos foi de 63,9% (5.474/8570), aumentando no grupo de 6 a 10 para 78,1% (3.164/4.049); no grupo de 11 a 15 anos para 75,5% (2.142/2.838), e no de 16 a 20 anos decresceu para 58,4% (201/344); enquanto que, entre aqueles que apresentavam mais de 20 anos houve um pequeno decréscimo para 54,6% (360/659). No que se refere à ocorrência de helmintos e protozoários, em relação a cor e sexo, foi verificado que a maior prevalência foi de 52,7% (168/3.203) e 47,1% (1502/3.189) para *T. trichiura* entre brancos do sexo masculino e feminino; enquanto que, entre os pretos dos sexos masculino e feminino, o *T. trichiura* apresentou 61,2% (271/443) e 57,4% (225/392) de prevalência, respectivamente. Em relação ao grupo de mulatos do sexo masculino e feminino as taxas de infecção mais elevadas foram para o *T. trichiura* com 60,6% (269/444) e 56,0% (251/448). Quanto ao abastecimento de água, foram estudadas 1.330 residências, todas situadas e distribuídas nas vilas e ficou constatado que 44,4% (591) recebiam água da rede pública. As demais casas serviam-se de poços próprios, cisternas, reservatórios ou de duas ou três formas de abastecimento. Somente 1,1% (15) das famílias tinham hábito de filtrarem água e, 22,5% (299) das casa possuíam banheiro incompleto (Tabela 4). Nos 629 domicílios visitados, somente 22,4% (141) estavam ligados à rede de esgoto. Entretanto, 19,5% (123) das famílias utilizavam fossa seca, 18,7% (118) fossa negra e 16,8% (106) usavam latrina (Tabela 5). Pelos dados observados na Tabela 6, das 1.056 famílias estudadas verificou-se que 22,4% (236) queimavam o lixo; 13,5% (143) preferiam enterrá-lo, e 12,3% (130) deixavam-no exposto em monturos sobre o solo. Somente em 6,6% (70) das casas, o lixo era recolhido pela coleta pública. Durante o período de 1965 a 1981, os anos de 1973 e 1975 foram aqueles que apresentaram a maior prevalência de enteroparasitos, 84,4% (830/984) e 81,2% (828/1020), respectivamente.

Assentamentos de trabalhadores rurais: Dos 305 assentados estudados, 49,5% (151) foram positivos para parasitos e 50,5% (154) mostraram resultados negativos. (Tabela 1). No assentamento de Charqueadas, 42,4% (39) dos 92 trabalhadores rurais apresentaram índices de positividade para parasitos intestinais, no de Capela de Santana 51,0% (76) dos 149 assentados estavam infectados, enquanto que, em Fazenda de São Pedro, 56,3% (36) dos 64 habitantes mostraram índices positivos para enteroparasitos. O maior percentual geral de infecção obtido em Charqueadas para protozoários foi de 16,3% (15) para *G. lamblia* e, entre os nematóides e cestóides, foi de 6,5% (6) para Ancilostomídeos (Tabela 2). As associações mais frequentes em infecções concomitantes entre helmintos e protozoários foram: Ancilostomídeos e *Strongyloides stercoralis* com 18,1% (2) e *G. lamblia* e *E. coli* com 36,4% (4), em um total de 11 combinações. No assentamento de Capela de Santana, o *A. lumbricoides* com 12,8% (19) e a *G. lamblia* com 13,4% (20) e *E. coli* com 18,1% (27) foram os parasitos que apresentaram os maiores percentuais de positividade. O poliparasitismo apresentou as combinações de *A. lumbricoides* e *E. coli* com 13,0% (3) e *S. stercoralis* e *G. lamblia* com 13,0% (3). Na Fazenda de São Pedro, 56,3% (36) das 64 crianças estudadas estavam infectadas por um ou mais parasitos intestinais. Os Ancilostomídeos e *G. lamblia*, ambos com um índice de infecção de 17,2% (11), foram os parasitos com a maior prevalência. As combinações que apresentaram a maior frequência foram: Ancilostomídeos e *G. Lamblia*, e *S. stercoralis* e *Hymenolepis nana*, todas com 12,5% (2). No que se refere à ocorrência de helmintos e protozoários, em relação à idade e sexo foi verificado que os maiores percentuais foram de 18,4% e 18,8% entre os assentados na faixa etária de 16 a 44 anos, respectivamente em Charqueadas e Capela de Santana. Em Charqueadas, as mulheres apresentaram o maior índice de infecção, 10,8% (7), enquanto que, em Capela de Santana, os homens com 11,4% (17) foram os mais parasitados. Entretanto, entre as crianças moradoras desses assentamentos, a ocorrência de helmintos e protozoários, em relação à idade e ao sexo, apresentou os percentuais de 42,2% e 12,9% entre as crianças do sexo masculino na faixa etária de 10 a 14 anos, na Fazenda de São Pedro e Charqueadas, respectivamente, enquanto que em Capela de Santana as crianças de 5 a 9 anos do sexo masculino apresentaram um percentual de infecção igual a 18,9%.

Cidade de Arroio dos Ratos: Em um total 1.186 estudantes examinados, 30,6% (363) apresentaram resultados positivos (Tabela 1), 24,3% (288) exibiram um único parasito e 6,3% (75), mais de um enteroparasito. Os índices de positividade da população estudada foram distribuídos nas zonas periférica da cidade, 56,0% (664), na urbana, 36,0% (427) e na rural, 8,0% (95). O percentual de infecção por helmintos e protozoários. foi de 20,5% (242) e 19,6% (231), respectivamente. A distribuição específica dos parasitos intestinais nessa população examinada mostrou que o maior percentual geral obtido para helmintos foi de 11,9% (141) para *A. lumbricoides* e 8,9% (105) para *G. lamblia*. Por outro lado, as associações dos parasitos mais frequentes em infecções concomitantes por helmintos e protozoários foram: *A. lumbricoides* e *T. trichiura* com 20,0% (15), *A. lumbricoides* e *Enterobius vermicularis* com 6,7% (5), *G. lamblia* e *E. coli* com 6,7% (5), e, *A. lumbricoides* e *G. lamblia* com 8,0% (6), em um total de 75 combinações. No que se refere à ocorrência de helmintos e protozoários, em relação ao sexo, foi verificado que os maiores percentuais de infecção foram obtidos entre os estudantes do sexo masculino com 54,3% (197), enquanto que entre os jovens do sexo

feminino o índice de infecção foi igual a 45,7% (166). A maior prevalência de infecções parasitárias, entre os alunos das escolas pesquisadas, foi na faixa etária de 6 a 11 anos.

DISCUSSÃO

Esse trabalho integrado de pesquisa e de extensão comunitária foi o resultado de uma ação conjunta entre a Pró-Reitoria de Extensão a Disciplina de Análises Parasitológicas, da Faculdade de Farmácia, UFRGS e a Prefeitura Municipal de Arroio dos Ratos. As infecções por parasitos intestinais podem efetivamente ser controladas, quando o estado sócioeconômico de uma região e as condições sanitárias do meio ambiente são implementadas, assim como implantadas outras medidas, tais como a educação para a saúde e a avaliação do estado nutricional da população. Tradicionalmente, a educação sanitária visa promover os hábitos de higiene, favorecer uma nutrição adequada e criar condições ambientais condizentes com o sadio crescimento e desenvolvimento físico e mental das populações.

Dados estatísticos relativos à prevalência de parasitos intestinais no Rio Grande do Sul são raros. Di Primio, em Porto Alegre (1957)⁶ e Moraes, em Santa Maria (1958)⁹ foram os primeiros parasitologistas a apresentarem resultados de inquéritos coproparasitológicos, no Rio Grande do Sul, com o objetivo de estudarem a epidemiologia das enteroparasitoses. A maioria dos trabalhos sobre infecções parasitárias sempre tiveram como objetivo o estudo da ação de medicamentos antiparasitários.

Em nosso estudo foi observado que os geohelmintos são mais prevalentes nas vilas periféricas, apesar de as condições sanitárias dessas vilas não serem essencialmente diferentes da dos assentamentos de trabalhadores rurais. Não nos parece lícita uma comparação imediata entre os resultados obtidos nas diferentes populações estudadas, apesar de terem sido realizados com amostras e técnicas coprológicas padronizadas. É evidente, pois, que as populações que deram origem às amostras apresentam características diferentes, não oferecendo dados comparáveis, sendo, pois, sua significância limitada.

A maior prevalência de infecção com helmintos transmitidos pelo solo (*A. lumbricoides*, *T. trichiura*, Ancilostomídeos e *S. stercoralis*) pode ser atribuída em grande parte aos fatores climáticos, além da baixa educação sanitária. Essa prevalência mostra diferenças significantes entre as três regiões estudadas, vilas periféricas (68,9%), assentamentos de trabalhadores rurais (49,5%) e Arroio dos Ratos (30,6%). Na cidade de Arroio dos Ratos, os baixos índices de infecção se devem, provavelmente, ao efeito da ação de antiparasitários (auto-medicação) e/ou a uma melhoria das condições sanitárias e de saúde da população.

As infecções pelo *A. lumbricoides*, *T. trichiura* e *G. lamblia* foram as mais prevalentes nesse estudo, os quais apresentaram maiores índices de positividade entre os moradores das vilas periféricas. O poliparasitismo foi demonstrado nas populações rurais, nas vilas periféricas, e na zona urbana de Arroio dos Ratos

Os resultados obtidos neste estudo coproparasitológico mostraram a imperiosa necessidade de levar a essas comunidades noções básicas de higiene e de educação sanitária. O diagnóstico de *E. coli*, *Endolimax nana*, *Iodamoeba butschlii* e *Chilomastix mesnili*,

parasitos comensais, reafirma que o saneamento básico e a educação sanitária são as mais importantes medidas administrativas que deverão ser implantadas.

Os índices de infecção parasitária encontrados nas vilas periféricas e nos assentamentos de trabalhadores rurais não refletem o estado real de saúde dessas populações e nem as condições atuais relacionadas com o saneamento básico. A maioria dos trabalhos publicados no Brasil sobre inquéritos das enteroparasitoses mostra elevada prevalência na população geral. Entretanto os dados não fornecem uma avaliação real da importância do problema, visto que os habitantes das vilas e dos assentamentos migraram por diversas regiões do Estado do Rio Grande do Sul antes de se estabelecerem em definitivo nesses locais.

Devido à inexistência de dados sobre a prevalência das enteroparasitoses em Arroio dos Ratos, torna-se muito difícil estimar a importância dos resultados obtidos entre os escolares nessa cidade, situada na zona carbonífera do Estado do Rio Grande do Sul

Entretando, é impossível uma comparação entre os resultados de nosso inquérito e os apresentados por outros pesquisadores em diferentes inquéritos em outras regiões do Estado e do País, por não terem sido realizados com amostras e exames padronizados.

Na prevenção das infecções parasitárias, é necessário identificar a fonte e o modo da infecção, os quais podem diferir em áreas e períodos diversos. Entretanto os inquéritos e as pesquisas devem continuar a serem realizados nas diferentes regiões do Estado, para identificar situações particulares características das diferentes regiões, com o objetivo de propor medidas sanitárias e de educação para melhorar o estado de saúde das populações. Os resultados obtidos neste inquérito levam a sugerir a necessidade de uma campanha de educação sanitária e medidas de saneamento básico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pró-Reitoria de Extensão da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a Faculdade de Farmácia e a Prefeitura Municipal de Arroio dos Ratos pelo apoio recebido na concretização deste estudo. Agradecem, também, aos alunos que cursaram a disciplina de Análises Parasitológicas, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, durante o 1º e 2º semestres do ano letivo de 1965 a 1997.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De Carli, G., Candia, E., Nunes, E., Silva, A., Martin, R., Antunes, I., Farias, G., Leiria, B. & Cancela, M.H. Extensão Comunitária - Estudo de enteroparasitoses e das condições sócioeconômicas das vilas periféricas de Porto Alegre, RS, Brasil, durante o período de 1965 a 1981. *Cad.Far.*,5:73-92, 1989.
2. De Carli, G.A. & Candia, E.F. Prevalência de geohelmintos entre escolares residentes nas vilas

- periféricas de Porto Alegre RS. *Rev.Bras.Farm.*,73:7-8, 1992.
3. De Carli, G.A., Candia, E.F. & Saraiva, O.J. Epidemiologiaa *Giardia lamblia* nas vilas periféricas da Grande Porto Alegre, *Rev.Bras.Farm.*,71:94-96, 1990.
 4. De Carli, G.A., Rott, M., Spalding, S.M., Ribeiro, L., Chaves, A., Da Silva, A.C., Wendorff, A., Matos, S. & Pozza, C. Incidência de enteroparasitas entre crianças residentes em assentamentos de colonos sem terra no Estado do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras.Farm.*, 75:98-100, 1994a
 5. De Carli, G.A., Spalding, S.M., Rott, M., Ribeiro, L., Chaves, A., Da silva, A.C., Wendorff, A., Matos, S. & Pozza, C. Incidência de enteroparasitas entre colonos sem terra nos assentamentos de Charqueadas e Capela de Santana no Estado do Rio Grande do Sul. *RBAC*, 26:123-125, 1994b
 6. Di Primio, R.F. Alguns aspectos da ancilostomose no Rio Grande do Sul. *An.Fac. Med.P.Alegre*, 17:39-49, 1957.
 7. Hoffman, W.A., Pons, J.A. & Janer, J.L. The sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. *Puerto Rico J.Publ.Health*, 9:281-298, 1934
 8. Lutz, A. O *Schistosoma mansoni* e schistosomatose, segundo observações feitas no Brasil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz*, 11: 121-155, 1919.
 9. Moraes, L.L. Incidência de helmintos e protozoários entre crianças de um orfanato feminino em Santa Maria. *Rev.Ass.Med.RGS*, 22:115-120, 1958.
 10. Populin, A.R.T., Paulino, A., Mexia, A.P.A., Borges, I. & de Araújo, S.M. Saúde em assentamentos rurais: uma questão de parcerias e política social. *RBAC*:29:41-44, 1997.

Tabela 1. Prevalência de enteroparasitos em uma população de 17.951 estudantes das vilas periféricas da Grande Porto Alegre, de assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos, RS, no período de 1965 a 1995.

Origem	das	Nº de Amostras	Amostras	Amostras
Amostras		Examinadas	Positivas	Negativas
Vilas Marginais		16.460 (100,0%)	11.341 (68,9%)	5.119 (31,1%)
Assentamentos		305 (100,0%)	151 (49,5%)	154 (50,5%)
Arroio dos Ratos		1.186 (100,0%)	363 (30,6%)	823 (69,4%)
Total		17.951 (100%)	11.855 (66,0%)	6.096 (34,0%)

Tabela 2. Distribuição específica dos parasitos intestinais em 17.951 pessoas examinadas nas vilas periféricas da Grande Porto Alegre, assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos, RS, durante o período de 1965 a 1995.

Parasitas	Frequência dos Parasitas * (%)		
	Vilas Marginais (n=16.460)	Assentamentos (n=305)	Arroio dos Ratos (n=1.186)
<i>Ascaris lumbricoides</i>	4.775 (29,0%)	28 (9,2%)	141 (11,9%)
<i>Trichuris trichiura</i>	7.092 (43,1%)	9 (3,0%)	50 (4,2%)
<i>Enterobius vermicularis</i>	189 (1,2%)	4 (1,3%)	27 (2,3%)
Ancilostomídeos	1.038 (6,3%)	29 (9,5%)	12 (1,0%)
<i>Strongyloides stercoralis</i>	495	15	8

	(3,0%)	(4,9%)	(0,7%)
<i>Taenia</i> spp.	153	2	2
	(0,9%)	(0,7%)	(0,2%)
<i>Hymenolepis nana</i>	604	54	2
	(3,7%)	(17,7%)	(0,2%)
<i>Hymenolepis diminuta</i>	6	0	0
	(0,1%)	(0,0%)	(0,0%)
<i>Entamoeba</i> spp.**	322	0	3
	(2,0%)	(0,0%)	(0,3%)
<i>Entamoeba coli</i>	2.271	48	72
	(13,8%)	(15,7%)	(6,1%)
<i>Endolimax nana</i>	223	4	45
	(1,4%)	(1,3%)	(3,8%)
<i>Iodamoeba butschlii</i>	197	4	6
	(1,2%)	(1,3%)	(0,5%)
<i>Giardia lamblia</i>	2.820	46	105
	(17,1%)	(15,1%)	(8,9%)
<i>Chilomastix mesnili</i>	43	1	0
	(0,3%)	(0,3%)	(0,0%)

* Muitas amostras contêm mais de um parasito.

** *Entamoeba* com características morfológicas da *Entamoeba histolytica*.

Obs. *E. histolytica* é usado para designar a existência de zimodemos patogênicos, enquanto *E. dispar* é agora usado para designar a existência de zimodemos não patogênicos.

Tabela 3. Associações de parasitas mais frequentes em infecções concomitantes por helmintos e protozoários, durante o período de 1965 a 1995 nas vilas periféricas da Grande Porto Alegre, assentamentos de trabalhadores rurais e na cidade de Arroio dos Ratos, RS.

Associações	Frequência*	%
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i>	1.835	29,2
<i>A. lumbricoides</i> + Ancilostomídeos	60	1,0
<i>A. lumbricoides</i> + <i>H. nana</i>	33	0,5
<i>A. lumbricoides</i> + <i>E. vermicularis</i>	15	0,3
<i>T. trichiura</i> + <i>H. nana</i>	115	1,8
<i>T. trichiura</i> + Ancilostomídeos	203	3,2
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + Ancilostomídeos	291	4,6
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>H. nana</i>	141	2,3
<i>A. lumbricoides</i> + <i>G. lamblia</i>	223	3,5
<i>A. lumbricoides</i> + <i>E.coli</i>	164	2,6

<i>T. trichiura</i> + <i>G. lamblia</i>	537	8,5
<i>T. trichiura</i> + <i>E. coli</i>	435	7,0
Ancilostomídeos + <i>E. coli</i>	35	0,6
Ancilostomídeos + <i>G. lamblia</i>	21	0,3
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>E. coli</i>	433	6,9
<i>A. lumbricoides</i> + <i>T. trichiura</i> + <i>G. lamblia</i>	344	5,5
<i>E. coli</i> + <i>G. lamblia</i>	124	2,0
<i>Entamoeba spp</i> ** + <i>E. coli</i>	31	0,5
Outras combinações	1.237	19,7
<hr/>		
Total	6.277	100,0

* Muitas amostras contêm mais de um parasita.

** *Entamoeba* com características morfológicas da *Entamoeba histolytica*.

Obs. *E. histolytica* é usado para designar a existência de zimodemos patogênicos, enquanto *E. dispar* é agora usado para designar a existência de zimodemos não patogênicos.

Tabela 4. Condições de abastecimento de água para consumo em 1.330 casas situadas nas vilas periféricas da Grande Porto Alegre, RS, 1965 a 1981.

Abastecimento de água	Frequência	Porcentagem (%)
Rede pública	591	44,4
Poço próprio	69	5,2
Cisterna	4	0,3
Reservatório	18	1,4
Duas formas de abastecimento	140	10,5
Três formas de abastecimento	194	14,6
Banheiro	299	22,5

Filtro (tratamento)	15	1,1
---------------------	----	-----

Tabela 5. Destino dos dejetos em 629 casas situadas nas vilas periféricas da Grande Porto Alegre, RS, 1965 a 1981.

Destino dos dejectos	Frequência	Porcentagem (%)
Rede de esgoto	141	22,4
Fossa seca	123	19,5
Fossa de fermentação	20	3,2
Fossa negra	118	18,7
Latrina	106	16,8
Sem latrina	5	0,8
Tanque séptico	3	0,5
Duas formas de destino	113	17,9

Tabela 6. Destino do lixo em 1056 casas situadas nas vilas periféricas da Grande Porto Alegre, RS, 1965 a 1981.

Destino do lixo	Frequência	Porcentagem (%)
Coleta pública	70	6,6
Queimado	236	22,4
Enterrado	143	13,5
Lançamento à superfície	130	12,3
Duas formas de destino	319	30,2
Possuem lata de lixo	158	14,9

