

## PREVALÊNCIA E TIPOS DE DISLIPIDEMIAS EM DOENÇAS ENDÓCRINAS COMUNS

Sónia do Vale, João Martin Martins

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral e Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Lisboa

### INTRODUÇÃO

As dislipidemias são um factor de risco major de doença cardiovascular susceptível de correcção. No entanto, por serem habitualmente assintomáticas, não é conhecida a sua real prevalência na população.

O objectivo deste trabalho foi definir a frequência e tipo de dislipidemias nas doenças endócrinas comuns que determinam a maior parte da prática assistencial.

### DOENTES E MÉTODOS

Foram estudados os doentes assistidos sucessivamente pelos autores, nos últimos dois anos, na Consulta Externa de Endocrinologia, com os seguintes diagnósticos: 1) OBESIDADE [Ob] (n=250); 2) DIABETES MELLITUS TIPO 2 [DM2] (n=150); 3) DOENÇA NODULAR DA TIROIDEIA (n=100); 4) TIROIDITE DE HASHIMOTO (n=100). Para efeitos de análise os grupos 3 e 4 foram englobados num grupo único de Doenças da Tiroide [DT].

Para além da avaliação específica de cada grupo, foram incluídos em to-

dos os casos o registo do colesterol, trigliceridos e HDLc, sendo as LDLc e VLDLc calculadas pela fórmula de Friedwald.

Os limites de referência utilizados foram: colesterol <200mg/dl, TG <150mg/dl, HDLc >40mg/dl, LDLc <130mg/dl, VLDLc <30mg/dl.

12% dos doentes cumpriam terapêutica hipolipemiante e 18% dos doentes do grupo DT estavam em hipotireoidismo; estes grupos não foram considerados individualmente excepto na análise preliminar.

A análise estatística foi realizada com o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Os resultados são expressos em termos percentuais, utilizando-se a tabela de contingência ( $\chi^2$ ) com correcção de Fisher para a comparação entre grupos.

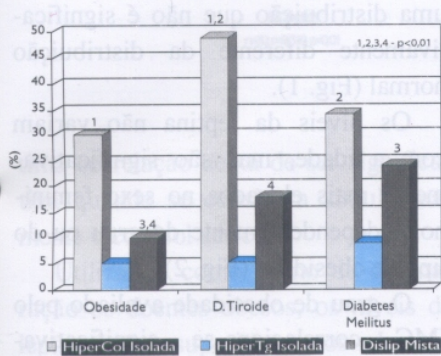
64% dos doentes apresentam Dislipoproteinemia – Tabela.

	Ob	DT	DM12
IIa	34	45	31
IIb	7	11	15
III	6	7	13
IV, V	0	1	3
↓ HDLc isolada	9	5	10
TOTAL	56	69	72

A hipercolesterolemia resulta sobretudo de uma Dislipoproteinemia tipo IIa (83% na Ob, 80% nas DT, 67% na DM2), mas a dislipoproteinemia tipo III também é uma causa relevante na DM2 (33%),  $p < 0,05$ . A hipertrigliceridemia resulta de uma Dislipoproteinemia tipo IIb (53% na Ob, 58% nas DT, 48% na DM2) ou tipo III.

**RESULTADOS**

A distribuição dos diferentes tipos de dislipidemia está indicada na Fig. 1. 58% dos doentes apresentavam dislipidemia. A frequência é significativamente diferente nos três grupos -  $\chi^2=58,5$ , g.l.=2,  $p < 0,001$  - sendo inferior na Ob (45%) em relação aos grupos DM2 (67%) e DT (72%), análise pos-hoc.



A frequência de Hipercolesterolemia isolada é significativamente diferente nos três grupos -  $\chi^2=27,7$ , g.l.=2,  $p < 0,001$  - sendo superior no grupo DT (49%) em relação aos grupos Ob (30%) e DM2 (34%), análise pos-hoc. A frequência de Dislipidemia Mista é também significativamente diferente nos três grupos -  $\chi^2=20,9$ , g.l.=2,

$p < 0,001$  - sendo inferior no grupo Ob (10%) em relação ao grupo DT (18%) e DM2 (24%), análise pos-hoc.

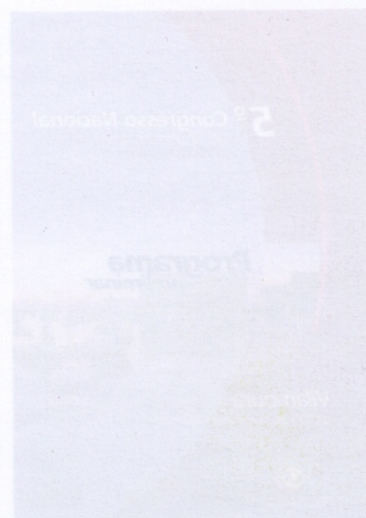
A hipercolesterolemia corresponde em 3/4 dos casos a uma Dislipoproteinemia tipo IIa, o que sugere um defeito de remoção das LDL, provavelmente polimorfismo genético da remoção mediada por receptores para a apoB100. Este é certamente o mecanismo operativo na Ob e nas DT. Apenas no caso da DM2 é que o aumento da síntese das VLDL e/ou aumento da conversão VLDL-LDL, em provável relação com o hiperinsulinismo e/ou insulino-resistência, pode ser um factor contribuinte relevante, o que explica a maior frequência de hipertrigliceridemia neste grupo.

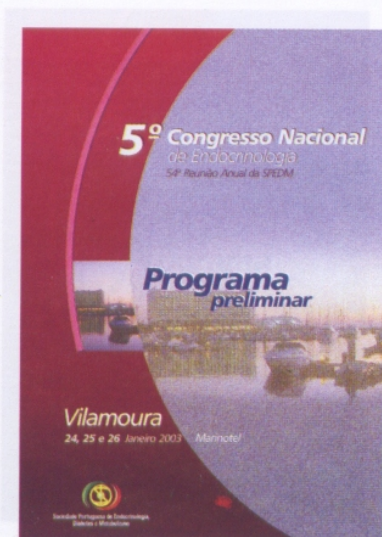
**DISCUSSÃO**

Encontramos uma elevada frequência de Dislipidemia/Dislipoproteinemia (55%/64%) em situações comuns na clínica endocrinológica.

Surpreendentemente, a Ob é o grupo com menor frequência de Dislipidemias, enquanto que as DT - apesar do eutiroidismo da maior parte dos doentes - é o grupo com maior frequência.

A dislipidemia mais frequente é a hipercolesterolemia, cerca de 2-3 vezes mais frequente que a hipertrigliceridemia em todos os grupos, o que contraria a opinião corrente relativa aos países mediterrânicos e o que seria de esperar de acordo com os mecanismos etiopatogénicos habitualmente invocados. Apenas na DM2 é que a hipertrigliceridemia é relativamente frequente.





## INTERVENÇÃO DA LEPTINA NA DIABETES MELLITUS TIPO 2. DADOS PRELIMINARES

João Martin Martins, Sónia do Vale

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral e Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Lisboa

### INTRODUÇÃO

O objectivo deste trabalho foi o de caracterizar a distribuição da leptina na Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e explorar a eventual intervenção desta hormona na patogénese da doença.

### DOENTES E MÉTODOS

Foram estudados os últimos 30 doentes com DM2 assistidos na Consulta Externa de Endocrinologia.

No protocolo de avaliação padronizado em uso para esta patologia, foi agora incluída a determinação da leptina, requisitada na primeira consulta. Como termo comparativo, foram igualmente considerados os últimos 30 doentes com obesidade, assistidos na Consulta Externa. Utilizou-se o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para a análise estatística. Os resultados são expressos pela média  $\pm$  desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram exploradas pela análise de variância factorial com teste de t-Student na análise pos-hoc. A relação entre as va-

riáveis foi estudada pela análise de regressão e correlação múltipla.

### RESULTADOS

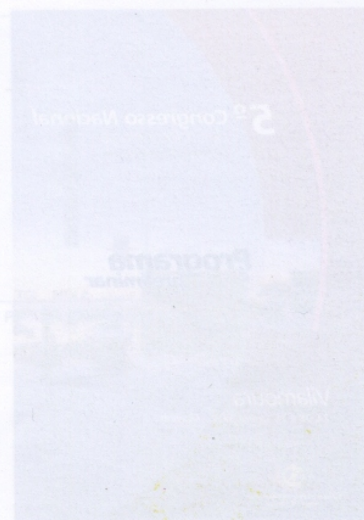
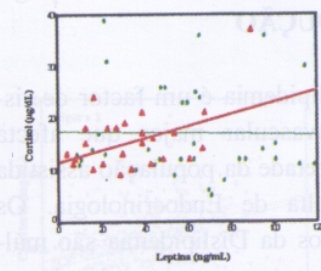
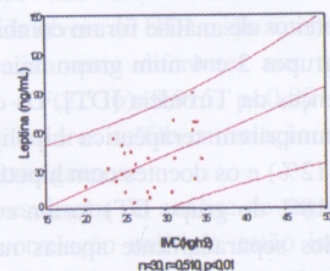
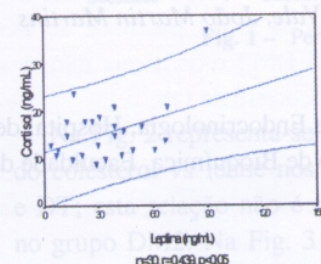
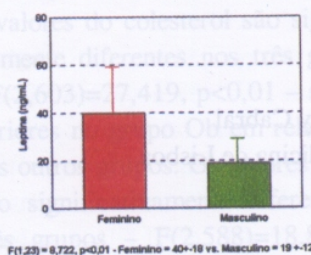
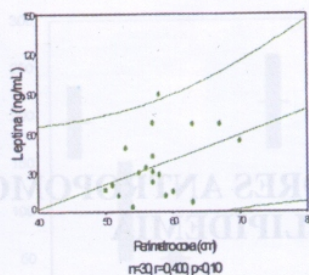
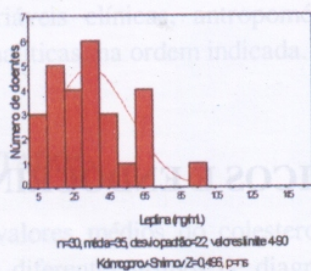
Os valores da leptina apresentam uma distribuição que não é significativamente diferente da distribuição normal (Fig. 1).

Os níveis da leptina não variam com a idade, mas são significativamente mais elevados no sexo feminino, independentemente do grau ou do tipo de obesidade (Fig. 2).

O grau de obesidade avaliado pelo IMC correlaciona-se significativamente com a leptina (Fig. 3). A adiposidade periférica avaliada pelo perímetro da coxa também se correlaciona com a leptina (Fig. 4) ao contrário da adiposidade central avaliada pelo perímetro umbilical.

Os níveis de leptina não variam com o controlo metabólico (HbA1c), com o perfil lipídico ou com a deterioração da função renal.

A leptina correlaciona-se directamente com o cortisol sérico (Fig. 5) e com o peptido C sérico, mas esta úl-



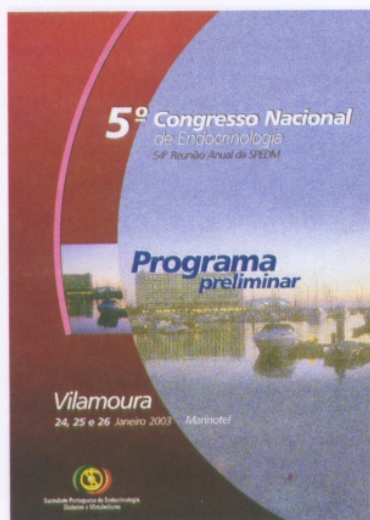
tima correlação deixa de ser significativa quando se considera simultaneamente o cortisol sérico.

Utilizando como termo de comparação os doentes obesos, os níveis de leptina são superiores nos doentes obesos, mas a diferença desaparece quando se tem em conta o IMC. Na obesidade a correlação leptina vs. Cortisol não é significativo (Fig. 6).

**DISCUSSÃO**

A leptina é o mediador endócrino do sistema homeostático de controlo das reservas energéticas. A leptina actua centralmente inibindo o comportamento alimentar e activando o eixo hipotálamo-hipofise-suprarenal e o

sistema nervoso vegetativo simpático. Estes dados justificam o interesse da determinação da leptina nos doentes com DM2. Os resultados deste trabalho mostram que existe uma dimorfia sexual dos níveis da leptina que não depende da adiposidade. A leptina influencia de facto a actividade do eixo HPA, o que é evidente ao nível dos níveis séricos do cortisol e pode contribuir para a conhecida dimorfia sexual deste eixo. Indirectamente pela influência sobre o eixo HPA a leptina influencia a insulino-resistência e a secreção de insulina. Independentemente do grau de obesidade a leptina contribui portanto para a insulino-resistência e pode explicar a dimorfia sexual conhecida deste parâmetro.



## FACTORES ANTROPOMÓRFICOS E ENDÓCRINOS DA DISLIPIDEMIA

Sónia do Vale, João Martin Martins

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral e Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Lisboa

### INTRODUÇÃO

A Dislipidemia é um factor de risco cardiovascular major que afecta mais de metade da população assistida na Consulta de Endocrinologia. Os mecanismos da Dislipidemia são múltiplos e controversos, sendo desconhecida a sua importância relativa. Por isso, pode ser importante identificar factores associados à dislipidemia em cada patologia específica, que permitam postular mecanismos precisos. Neste trabalho foram especificamente considerados factores antropomórficos e endócrinos.

### DOENTES E MÉTODOS

Procedeu-se à análise dos dados dos doentes assistidos consecutivamente pelos autores nos últimos dois anos, na consulta externa de Endocrinologia, com os seguintes diagnósticos: 1) Obesidade [Ob] (n=300); 2) Diabetes Mellitus tipo 2 [DM2] (n=150); 3) Doença Nodular da Tiroideia (n=100); 4) Tiroidite de Hashimoto (n=100). Para

riáveis foi estudada pela análise de efeitos de análise foram combinados os grupos 3 e 4 num grupo único de Doenças da Tiroideia [DT]. Os doentes a cumprir terapêutica hipolipemiante (12%) e os doentes com hipotiroidismo (18% do grupo DT) foram considerados separadamente apenas na análise preliminar.

Em todos os doentes foi obtido o lipidograma – colesterol, TG e HDLc. Os parâmetros clínicos e antropomórficos seleccionados foram: idade, diagnóstico, IMC e relação abdómen/coxa (AC). Os parâmetros analíticos considerados foram: T3, T4 e TSH em todos os grupos; com a adição da glicemia, insulinemia, ACTH e cortisol nos grupos Ob e DM2; testosterona na Ob; e HbA1c na DM2.

Utilizou-se o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) para a análise estatística. As variáveis são expressas como média±dp. Os grupos foram comparados pela análise de variância com correcção de Bonferroni para análise pos-hoc. A relação entre as variáveis foi explorada por análise de regressão múltipla, com a introdução sequencial

das variáveis clínicas, antropomórficas e analíticas, na ordem indicada.

**RESULTADOS**

Os valores médios do colesterol e TG nos diferentes grupos de diagnóstico estão representados na Fig. 1.

Os valores do colesterol são significativamente diferentes nos três grupos –  $F(2,603)=27,419, p<0,01$  – sendo inferiores no grupo Ob em relação aos dois outros grupos. Os valores dos TG são significativamente diferentes nos três grupos –  $F(2,588)=18,825, p<0,001$  – sendo mínimos na Ob, intermédios nas DT e máximos na DM2. Os níveis do HDLc são também significativamente diferentes nos três grupos –  $F(2,536)=8,915, p<0,001$  – sendo inferiores na Ob em relação aos dois outros grupos.

Os resultados da análise de regressão e correlação múltipla estão indicados na tabela, sendo apresentados apenas os factores estatisticamente significativos.

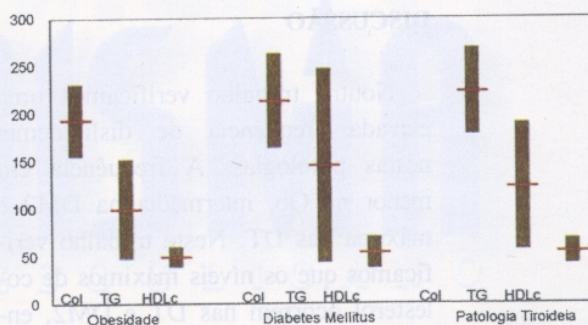
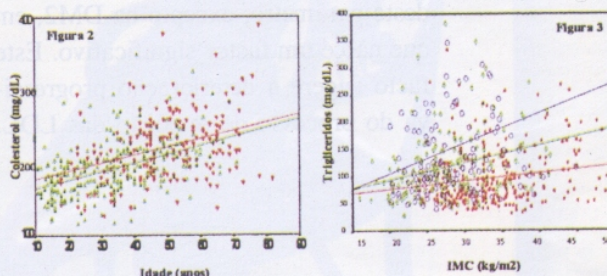


Fig. 1 – Perfil lipídico

Na Fig. 2 representa-se a regressão do colesterol vs idade nos grupos Ob e DT; esta relação não é significativa no grupo DM2. Na Fig. 3 representa-se a regressão dos TG vs IMC nos três grupos – Ob, DT, DM2.



DOENÇAS DA TIROIDEIA	COLESTEROL	TRIGLICÉRIDOS
Idade	13%	7%
IMC	4%	7%
TSH	3%	3%*
TOTAL	19%	11%

OBESIDADE	COLESTEROL	TRIGLICÉRIDOS
Idade	22%	19%
IMC		5%*
Razão abdómen/coxa (AC)	6%	12%
Testosterona		5%
TOTAL	22%	30%

DIABETES MELLITUS	COLESTEROL	TRIGLICÉRIDOS
IMC	2%	3%
AC		5%
HbA1c	2%	10%
TOTAL	2%	32%

\* este factor deixa de ser significativo na análise de correlação múltipla

**DISCUSSÃO**

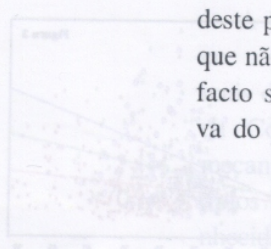
Noutro trabalho verificámos uma elevada frequência de dislipidemia nestas patologias. A frequência era menor na Ob, intermédia na DM2 e máxima nas DT. Neste trabalho verificamos que os níveis máximos de colesterol ocorrem nas DT e DM2, enquanto que os níveis máximos de TG ocorrem na DM2 e os níveis mínimos de HDLc ocorrem na Ob.

A análise de regressão múltipla revelou diferenças importantes entre o colesterol e os TG de acordo com o seu significado biológico.

Para o COLESTEROL, entre os factores considerados, apenas a idade é uma factor relevante comum, explicando cerca de 20% da variabilidade deste parâmetro, excepto na DM2, em que não é um factor significativo. Este facto sugere a deterioração progressiva do processo de remoção das LDL.

Na DM2 outros factores são provavelmente mais relevantes, como por exemplo, a glicação não enzimática das LDL sugerida pela relação com a HbA1c. Nas DT um factor adicional é obviamente a disfunção tiroideia. No entanto, com excepção da idade, todos estes factores são apenas marginais, explicando menos de 5% da variabilidade do colesterol.

Em relação aos TRIGLICERIDOS a idade continua a ser um factor significativo, mas relevante apenas na Ob, sugerindo uma diminuição progressiva da capacidade de transformação das VLDL em LDL. Igualmente importante em todos os grupos é o grau e/ou o tipo de obesidade sugerindo a importância da síntese hepática de VLDL. A influência da disfunção tiroideia é irrelevante neste caso, enquanto a qualidade do controlo metabólico adquire maior importância na DM2.



Por isso, pode ser importante identificar factores associados à dislipidemia em cada patologia específica, que permitam postular mecanismos precisos.

OBESIDADE	DM2	DT
12%	15%	25%
18%	22%	35%
25%	30%	45%
35%	40%	55%
45%	50%	65%
55%	60%	75%
65%	70%	85%
75%	80%	95%
85%	90%	100%

## INSULINOTERAPIA NA DIABETES MELLITUS TIPO 2. ANÁLISE FACTORIAL DA DECISÃO CLÍNICA

Sónia do Vale, João Martin Martins

Serviço de Endocrinologia, Hospital de Curry Cabral e Instituto de Bioquímica, Faculdade de Medicina de Lisboa

### INTRODUÇÃO

O objectivo deste trabalho foi o de identificar *a posteriori* alguns factores subjacentes à decisão de iniciar a insulinoterapia nos doentes com Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2).

### DOENTES E MÉTODOS

Foram incluídos neste estudo, os últimos 100 doentes consecutivos com DM2, assistidos na Consulta Externa de Endocrinologia. Utilizaram-se os dados do protocolo de avaliação clínica e analítica padronizada em uso para esta patologia. A comparação entre os grupos foi feita por análise de variância factorial com comparações *post-hoc* com o teste de t-Student, utilizando o programa Statistical Package for the Social Sciences (SPSS).

### RESULTADOS

Dos 100 doentes considerados, 62 cumpriam terapêutica com antidiabé-

	OT	IT
Glicemia (mg/dl)	160±28	104±17
HbA1c (%)	7,3±2,4	9,3±2,3
Triglicéidos (mg/dl)	81±22	40±24
Colésterol (mg/dl)	214±49	201±43
Contagem U (x10 <sup>9</sup> /l)	125	123

Serrano, Ana Alegria, Nuno Miranda

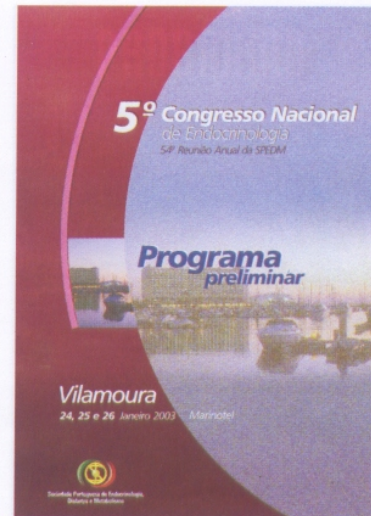
Curry Cabral e Instituto de Bioquímica,

ticos orais (OT) e 38 cumpriam terapêutica com insulina (IT).

Sob o ponto de vista clínico, não havia diferenças significativas no sexo ou idade. No entanto os doentes do grupo IT tinham uma maior duração da doença e menor obesidade, com maior frequência de retinopatia, mas sem diferenças significativas nos níveis tensionais ou na frequência de cardiopatia isquémica (Tabela I).

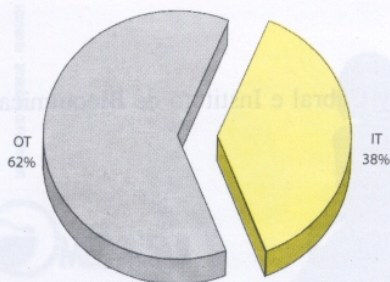
	OT	IT
Sexo (M/F)	40/60	34/64
Idade (anos)	57±13	62±10
<b>Duração (anos)</b>	<b>7±9</b>	<b>15±11</b>
Nº consultas	7±9	7±10
<b>IMC (kg/m<sup>2</sup>)</b>	<b>29,9±5,8</b>	<b>26,9±4,8</b>
AC	1,62±0,22	1,70±0,22
<b>Retinopatia</b>	<b>17%</b>	<b>46%</b>
Nefropatia	31%	43%
HTA	66%	62%
CI	21%	30%

Sob o ponto de vista analítico, os doentes do grupo IT apresentavam um pior controlo metabólico e menor reserva de insulina (Tabela II).





	OT	IT
Glicemia (mg/dl)	166±58	194±77
HbA1c (%)	7,7±2,4	9,3±2,3
Peptido CU (µg/24h)	81±52	40±54
Colesterol (mg/dl)	214±49	201±43
Triglicéridos (mg/dl)	162±197	151±136
Cortisol U (µg/24h)	53±29	40±34
Aldost U (µg/24h)	7±4	12±25



DISCUSSÃO

A decisão de iniciar a insulinoterapia em doentes com DM2 é baseada na avaliação clínica global e deve ter em conta uma multiplicidade de facto-

res. De acordo com os dados deste estudo, a decisão de iniciar a insulinoterapia, de forma implícita ou explícita ocorre preferencialmente em doentes com doenças mais prolongada – independentemente da idade, normoponderais, pior controlo metabólico e evidência laboratorial de menor reserva de insulina. Naturalmente que os doentes apresentam maior frequência de complicações crónicas microvasculares da doença, mas pelo contrário não apresentam níveis tensionais mais altos nem uma maior frequência de complicações macrovasculares. Estes dados levantam a hipótese de que os doentes que realizam insulinoterapia, constituem um, subgrupo particular com menor reserva da célula β mas também com menor hiperinsulinismo e insulino-resistência e menos evidência de síndrome plurimetabólico. Adicionalmente, estes dados não evidenciam qualquer efeito deletério da insulinoterapia neste tipo de complicações.

## TROMBOCITOPÉNIA ESPÚRIA NA GRAVIDEZ. A PROPÓSITO DE UM CASO\*

Jorge Lima\*\*, Augusta Borges, Fátima Serrano, Ana Alegria, Nuno Miranda

Maternidade D. Alfredo da Costa, Serviço de Hematologia – Instituto Português de Oncologia/FG Lisboa

### Introdução

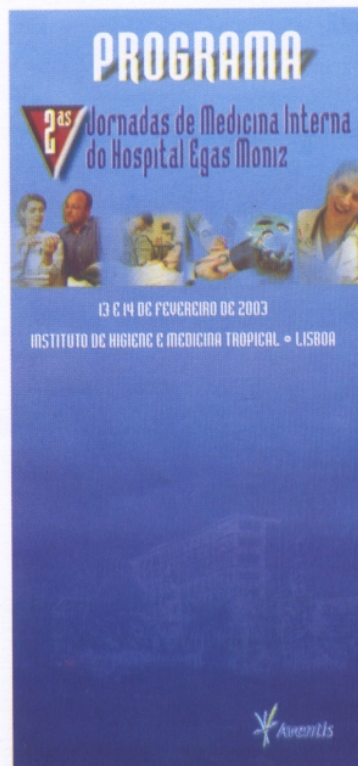
- Não ocorrem alterações significativas no número, na função e no tempo de vida média das plaquetas, durante a gravidez. No entanto, esta pode ser complicada por várias anormalidades nas plaquetas ou as plaquetas podem estar envolvidas em patologias da gravidez. A trombocitopénia é a alteração mais frequente das plaquetas que ocorre na gravidez (1). Pode surgir em várias situações clínicas e podem estar envolvidos mecanismos imunológicos e não imunológicos. Além dos riscos maternos, o feto pode ser afectado secundariamente, especialmente em casos de trombocitopénia imunológica.
- O estudo etiológico destas situações obedece a um protocolo de

investigação laboratorial que inclui obrigatoriamente a colheita de sangue venoso em tubos com anticoagulantes diferentes (EDTA e citrato), bem como a pesquisa de anticorpos antiplaquetários, estudo de trombofilias, doenças autoimunes, infecciosas, entre outras.

- A maioria dos actuais contadores automáticos de células são aparelhos altamente eficientes, permitindo uma contagem precisa das plaquetas a partir de sangue total. Estes contadores reconhecem as células como partículas em suspensão e estão programados para separá-las de acordo com a sua dimensão. As plaquetas têm um volume que varia entre 2 a 20 fL, sendo que partículas não plaquetárias, tais como fragmentos de glóbulos vermelhos ou de células leucémicas podem ser contadas como plaquetas por caírem nesse intervalo. Este mesmo princípio rígido pode condicionar trombocitopénias espúrias quando as plaquetas excedem os 20 fL de volume ou quando a presença de ácido EtilenoDiaminoTetraAcético (EDTA),

\* Comunicação apresentada nas 2as Jornadas de Medicina Interna do Hospital de Egas Moniz (13 e 14 de Fevereiro de 2003, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa)

\*\* Assistente Convidado de Bioquímica Fisiológica da Faculdade de Medicina de Lisboa e Interno do Complementar de Ginecologia-Obstetrícia da Maternidade Dr. Alfredo da Costa



utilizado como anticoagulante nos tubos de colheita, forma agregados plaquetários que excedem os 20 fL de volume ou condiciona a aderência das plaquetas aos granulócitos *in vitro* (2).

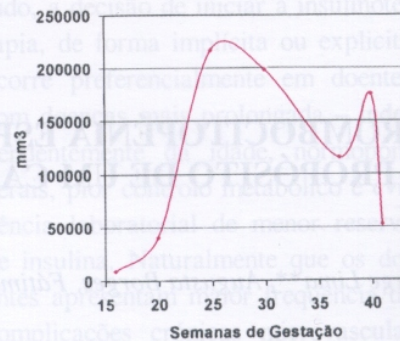
**CASO CLÍNICO**

- Grávida de 33 anos, caucasiana
- 3ª Gestação, com 2 Partos eutócicos anteriores
- Enviada à Consulta de Alto Risco da MAC por trombocitopénia às 25 semanas de gestação
- Antecedentes de tromboflebite profunda do MI dto, provavelmente relacionada com o uso de contraceptivos orais
- Detectou-se pela 1ª vez quadro de trombocitopénia grave às 16 semanas: 10.400 plaquetas/ $\mu$ L
- Sem sinais de discrasia hemorrágica
- Sem referência a uso de fármacos para além do ácido fólico

**Laboratório**

- Contagem das plaquetas durante a gravidez:
  - Grande oscilação dos valores
  - Esfregaço com microagregados plaquetários
- Provas de coagulação sem alterações
- Anticorpos antiplaquetários: negativos
- ANA negativo
- Ac anti-DNA negativo
- Proteína S, Proteína C e Antitrombina III dentro dos valores de referência
- Anticorpos anti-fosfolípidos negativos
- Restantes análises de vigilância de rotina sem alterações

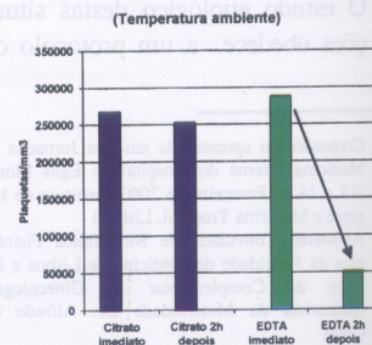
Contagem de Plaquetas



**Gravidez e Parto**

- **Durante a gravidez**
  - Parâmetros de avaliação do bem estar fetal dentro do normal; Crescimento fetal no P75
- **Trabalho de parto**
  - 10H: 87.600 plaquetas/ $\text{mm}^3$
  - 18H: 177.000 plaquetas/ $\text{mm}^3$
- **Parto**
  - Eutócico com episiotomia médio-lateral
  - Nado-vivo masculino 4300g Apgar 9/10
  - Perdas hemáticas normais
- **1º dia do Puerpério**
  - 12H: 34.000 plaquetas/ $\text{mm}^3$
  - 20H: 81.100 plaquetas/ $\text{mm}^3$
  - Parâmetros puerperais normais.

**Investigação Laboratorial**



**Diagnóstico:** Agregação plaquetária induzida pelo EDTA

**COMENTÁRIOS**

- O reconhecimento deste artefacto laboratorial é importante de forma a evitar investigações desnecessárias e abordagens maternas e fetais inapropriadas.

- O exame cuidadoso do esfregaço sanguíneo em todas as doentes trombocitopénicas é a forma mais segura de poder excluir uma trombocitopénia espúria.

**Bibliografia**

1. Biswas A, Arulkumaran S, Ratnam S. Disorders of Platelets in Pregnancy. *Obstet Gynecol Surv* 1994; 49 (8): 585-594.
2. Solanki DL, Blackburn BC. Spurious Thrombocytopenia During Pregnancy. *Obstet Gynecol* 1985; 65: 14S-17S.

	(0-2h PO)	(48h PO)	(72h PO)	(5 <sup>a</sup> dia PO)
TA	335/80	130/80	-	-
Hb	9,79	9,71	12,1	12,1
Hct	300	163 000	231 000	476 000
PLT	134/545	56/338	39/250	1058
PLT	970	730		

## SÍNDROME DE HELLP. A PROPÓSITO DE UM CASO CLÍNICO\*

André Sampaio\*\*, Jorge Lima, Elsa Dias, Clara Soares, Isabel Ramos

Serviço de Medicina Materno-Fetal da Maternidade Dr. Alfredo da Costa

### INTRODUÇÃO

O síndrome de HELLP caracteriza-se por **Hemólise** (alteração de esfregaço de sangue periférico, bilirrubina total > 1,2 mg/dl, LDH > 600 UI/l), **Elevação de enzimas hepáticas** (TGO > 70 UI/l, LDH > 600 UI/l) e **Trombocitopénia** (plaquetas < 100 000/ $\mu$ l). A sintomatologia pode variar de "mal estar" até epigastralgias intensas, vômitos e hematemeses. Dos 2/3 que podem surgir antes do parto só 10% surgem em idades gestacionais (IG) < 27 semanas.

70 a 85% dos casos acompanham-se de pré-eclâmpsia (hipertensão arterial e proteinúria surgindo após as 20 semanas de gestação). A mortalidade materna (0-24%) resulta de ruptura hepática, coagulação intra-vascular disseminada (CID), insuficiência renal aguda (IRA), edema pulmonar, trombose das carótidas e acidente vascular cerebral (AVC). A mortalidade peri-

natal deve-se à prematuridade, atraso de crescimento intra uterino (ACIU) e descolamento prematuro de placenta normalmente inserida (DPPNI). O diagnóstico atempado e a terapêutica adequada reduzem a taxa de morbimortalidade materna e fetal.

### CASO CLÍNICO

Os autores apresentam um caso de uma grávida de 29 anos, índice obstétrico 0010, com 25 semanas (s) mais 3 dias (d).

No dia 13 de Janeiro de 2003 recorreu ao serviço de urgência da MAC com queixas de dor abdominal tipo cólica que associou à ingestão de iogurte na véspera e carne à jardineira ao almoço. Negava cefaleias, náuseas ou vômitos.

Ao exame objectivo apresentava timpanismo à palpação abdominal. **TA 157/84 mm Hg**. Colo uterino formado e fechado. Leucorreia abundante tipo vaginose.

*Analiticamente:*

**0.00h Hb 14,7 g/dl (Htc 43%),**

\* Comunicação apresentada nas 2as Jornadas de Medicina Interna do Hospital de Egas Moniz (13 e 14 de Fevereiro de 2003, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Lisboa)

\*\* Interno do Complementar de Ginecologia-Obstetrícia da Maternidade Dr. Alfredo da Costa

leucócitos 14 700/  $\mu$ l (63% neutrófilos (N)), plaquetas 244 000/  $\mu$ l. A salientar na bioquímica os valores de **LDH 963 UI/l, TGO/TGP 101/107 UI/l**, valores que foram determinantes no internamento da doente. Ácido úrico 4,1 mg/dl, fosfatase alcalina 84 UI/l,  $\gamma$ -GT 14 UI/l. Tempo de protrombina (TP) 12,6 segundos (s), tempo de trombo-plastina parcial activada (APTT) 24,1s, INR 0,9. Urina II: leucócitos 500/ml, proteínas 75 mg/dl.

Durante as 12 horas seguintes a TA manteve valores normais:

	0 H	4.30 H	6 H	8 H	9.30 H	11.51 H	13 H
TAS	157	123	87	125	138	147	128
TAD	84	56	52	70	81	89	70

Apesar disso às 15.00h: Plaquetas 160 000, LDH 1323, TGO/TGP 184/74.

**2º dia.** 25s+4d, TA 129/75 mmHg. Albustix +++.

**Ecografia obstétrica:** Diâmetro Bi-Parietal (DBP) 58 mm, Perímetro Abdominal (PA) 210 mm, Comprimento Fémural (CF) 46 mm (percentil (P) 25-50). Placenta anterior não prévia. Líquido amniótico (LA) normal. Índice sistodiastólico (I S/D) na artéria uterina 2,7 (normal para a idade gestacional). Artérias uterinas com incisura protodiastólica (este sinal presente após as 23s associa-se a atraso de crescimento intra-uterino (ACIU) e pré-eclâmpsia).

Iniciou neste dia a corticoterapia para maturação pulmonar fetal (**betametasona 12mg, 2 doses IM separadas por 24 horas**).

**3º dia.** 25s+5d, TA 129/75 mmHg. Albustix ++.

Ecografia hepato-biliar-pancreática e renal sem alterações. Serologias negativas, imune para a rubéola e toxoplasmose.

**4º dia.** 25s+6d, TA 120/60 mmHg. Albustix ++.

Hb 14,1 (Htc 41,4%), Plaquetas 110 000/ $\mu$ l, LDH 774, TGO/TGP 78/187.

**5º dia. 26s.**

**0.00h** refere epigastralgias. TA 145/96 mmHg.

**0.30h** TA 170/100 mmHg. Nifedipina 5 mg SL. Transfere-se para a UCI.

**1.00h** TA 167/102 mmHg.

Posteriormente surge um quadro de agitação com agravamento das epi-

gastralgias e decide-se interromper a gravidez, pela hipótese de hematoma subcapsular do fígado/rotura hepática.

**5.11h** Parto Distócico Cesariana de emergência (com incisão mediana infra-umbilical sob anestesia geral por suspeita de hemorragia subcapsular hepática).

Recém nascido nado vivo do sexo feminino com 621 gramas (atraso de crescimento intra-uterino (ACIU); <P 10), Índice Apgar (IA) 4/7. Placenta enviada para anatomia patológica.

À palpação a superfície hepática apresentava superfície lisa, consistência e tamanhos normais.

Abaixo apresenta-se um quadro representativo da evolução tensional e analítica pertinente antes e após o parto:

	0.30 h	Pós-op	(24h PO)	(48h PO)	72h PO	(5º dia PO)
TA	170/100	130/75	135/80	130/80	-	-
Hb	13,7	13,9	9,95	9,79	9,71	12,1
Plaquetas	185 000	84 600	98 900	163 000	231 000	476 000
TGO/TGP	161/63	738/1139	526/858	134/545	56/338	39/250
LDH	493	> 3 000	2 045	970	730	1058



## EVALUATION OF LIPOPOLYSACCHARIDE AGGREGATION BY LIGHT SCATTERING SPECTROSCOPY

Nuno C. Santos<sup>1</sup>, Ana C. Silva<sup>1</sup>, Miguel Castanho<sup>2,3</sup>, J. Martins-Silva<sup>1</sup>, Carlota Saldanha<sup>1</sup>

### ABSTRACT

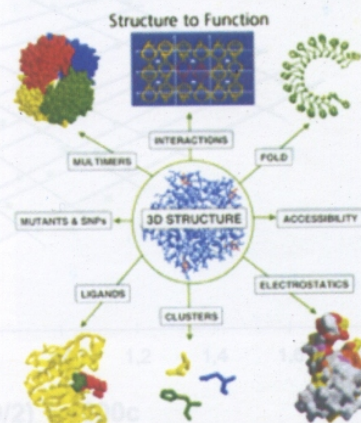
Lipopolysaccharides (LPS) are cell wall components of Gram negative bacteria. They behave as bacterial endotoxins and their release in bloodstream is determinant on the development of several pathologies. These amphipathic molecules can self-aggregate into different supramolecular structures when their concentration is higher than the apparent Critical Micelle Concentration (CMC<sub>a</sub>). Light Scattering Spectroscopy (both Static and Dynamic) was used to directly characterize the aggregation process of LPS from *Escherichia coli* serotype 026:B6. The results point out to a CMC<sub>a</sub> value of 14 µg/mL, as well as to the existence of pre-micelle LPS oligomers below this concentration. Both structures were characterized in terms of molecular weight ( $5.5 \times 10^6$  and  $16 \times 10^6$  g mol<sup>-1</sup>, below and above

the CMC<sub>a</sub>, respectively), interaction with the aqueous environment, gyration radius (56 and 105 nm), hydrodynamic radius (60 and 95 nm) and geometry of the supramolecular structures (nearly spherical). The search for drugs that interact with the aggregates, changing the CMC<sub>a</sub> and conditioning LPS interactions in the bloodstream, can be a new way to prevent certain bacterial endotoxins related pathologies.

### 1. INTRODUCTION

Lipopolysaccharides (LPS; Fig. 1), cell wall components of Gram negative bacteria, behave as bacterial endotoxins and are determinant on the development of a wide range of pathologies. During an infection, the pathologies result from LPS release into the blood stream, leading to fever, diarrhoea and inflammations. Amphipathic molecules, such as LPS, may occur as monomers or pre-micelle oligomers, but they can also aggregate into large supramolecular structures when the LPS concentration in blood is higher than the apparent Critical Micelle Concentration (CMC<sub>a</sub>). The

**Biophysical Society**  
47th Annual Meeting  
March 1-5, 2003  
San Antonio, Texas



<sup>1</sup> Instituto de Bioquímica / Instituto de Medicina Molecular, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisbon, Portugal. (nsantos@fm.ul.pt)

<sup>2</sup> Departamento de Química e Bioquímica, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal.

<sup>3</sup> Centro de Química-Física Molecular, Instituto Superior Técnico, Lisbon, Portugal.



Light Scattering Spectroscopy experiments were carried out with LPS from *Escherichia coli*, serotype O26:B6, in PBS.

Light from a Spectra-Physics He-Ne Laser, model 127 (632.8 nm, 35 mW) impinges on the scattering sample. The position of a

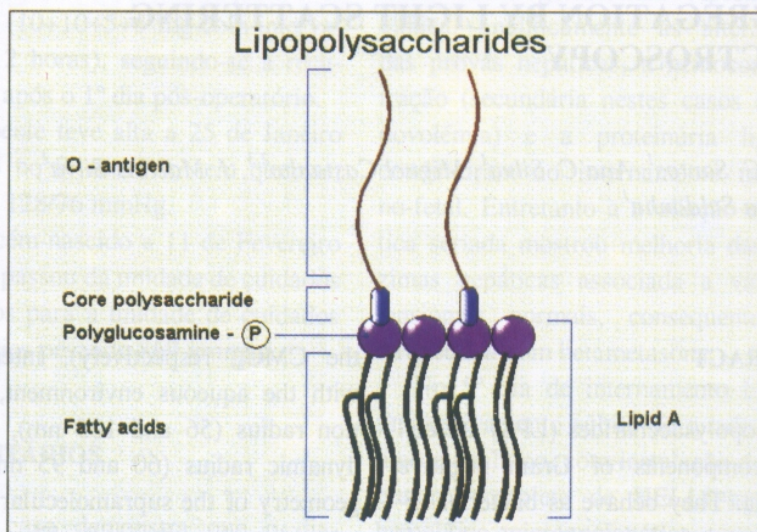


Fig. 1 - Lipopolysaccharides (LPS) molecular structure

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Apparatus

Light scattering measurements were carried out in a BI-2030AT (Brook-

haven Instruments). Light from a Spectra-Physics He-Ne Laser, model 127 (632.8 nm, 35 mW) impinges on the scattering sample. The position of a

2.2. Static light scattering

Static light scattering (SLS) meas-

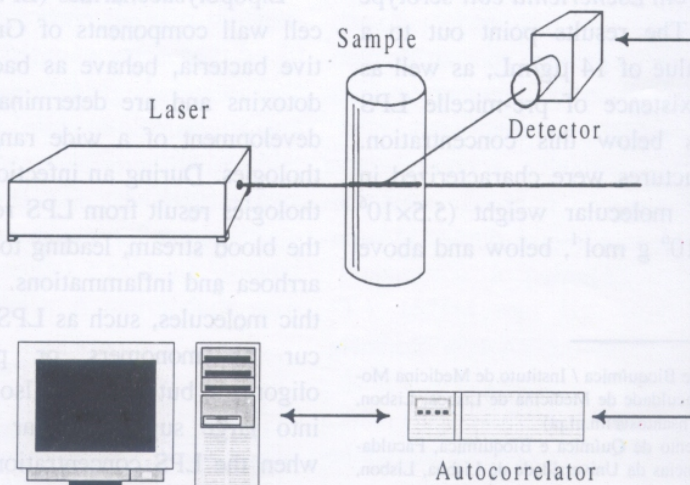


Fig. 2 - Schematic representation of the light scattering apparatus

urements were carried out using the Zimm method, in order to obtain the gyration radius ( $R_g$ ), molecular weight ( $M_w$ ) and second virial coefficient ( $A_2$ ). The Zimm plot (Fig. 3) is based on equation (1),

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \left( 1 + \frac{16\pi^2 n_o^2 R_g^2}{3\lambda^2} \sin^2 \left( \frac{\theta}{2} \right) \right) \left( \frac{1}{M_w} + 2A_2 c \right) \quad (1)$$

$$K = \frac{4\pi^2 n_o^2 \left( \frac{dn}{dc} \right)^2}{N_A \lambda^4} \quad (2)$$

- c – Concentration
- $R_\theta$  – Rayleigh ratio, obtained for each c and  $\theta$  (proportional to the scattering intensity).
- $n_o$  – Refractive index of the solvent.
- $dn/dc$  – Specific refractive index increment of the solution.

### 2.3. Dynamic Light Scattering

Diffusion coefficients were obtained using dynamic light scattering (DLS), by the standard CONTIN method, considered to be the more suitable for the study of systems with broad size distributions. This method, provides the distribution of sizes of the particles in solution.

### 3. RESULTS

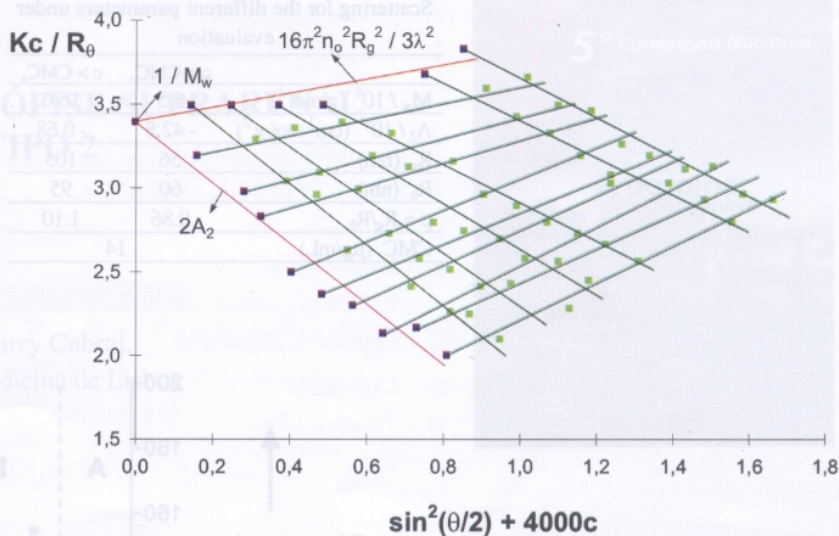


Fig. 3 – Representative Zimm plot

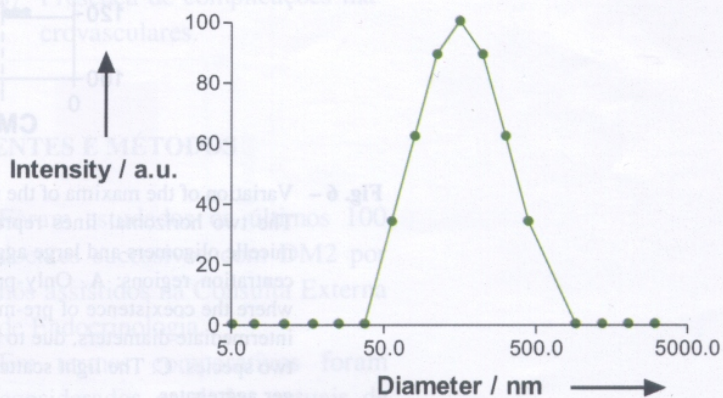


Fig. 4 – Size distribution of the aggregates, obtained by dynamic light scattering ( $c = 80 \mu\text{g/mL}$ ;  $\theta = 90^\circ$ ).

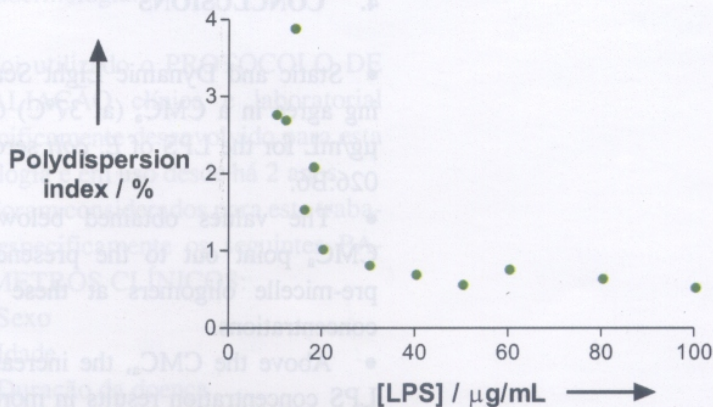


Fig. 5 – Polydispersion indexes obtained by dynamic light scattering and the method of cumulants

TABLE I

Values obtained by Static and Dynamic Light Scattering for the different parameters under evaluation

	$c < CMC_a$	$c > CMC_a$
$M_w / 10^6$ (g mol <sup>-1</sup> )	5.5	16.0
$A_2 / 10^{-4}$ (cm <sup>3</sup> mol g <sup>-2</sup> )	-42.8	-0.68
$R_g$ (nm)	56	105
$R_h$ (nm)	60	95
$\rho = R_g/R_h$	0.86	1.10
CMC ( $\mu\text{g/mL}$ )	14	

- The increase of the  $A_2$  value above the  $CMC_a$  (less negative) indicates a better interaction with the aqueous environment, possibly due to a better shielding of LPS hydrophobic domains upon aggregation.

- The value of  $\rho$  below the  $CMC_a$  is in agreement with a nearly spherical geometry. Its increase indicates a dif-

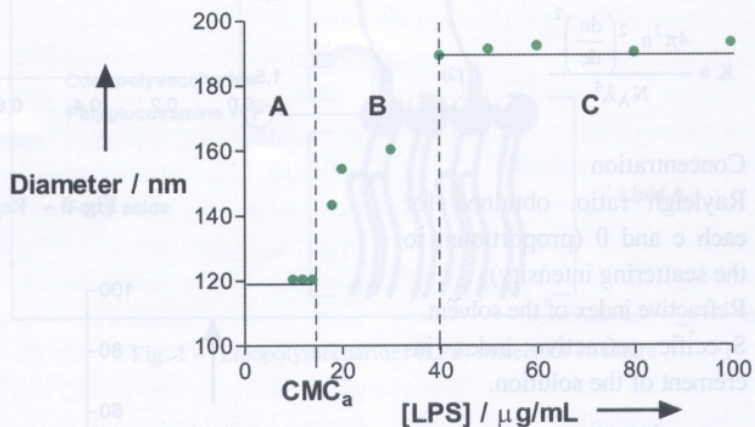


Fig. 6 - Variation of the maxima of the size distributions obtained by Dynamic Light Scattering. The two horizontal lines represent the average hydrodynamic diameters of the pre-micelle oligomers and large aggregates. The two vertical dashed lines define three concentration regions: A. Only pre-micelle oligomers are present. B. Transition range, where the coexistence of pre-micelle oligomers and larger aggregates leads to apparent intermediate diameters, due to the balance of the light scattering contributions from the two species. C. The light scattering information arise (almost) exclusively from the larger aggregates

4. CONCLUSIONS

- Static and Dynamic Light Scattering agree in a  $CMC_a$  (at 37°C) of 14  $\mu\text{g/mL}$  for the LPS of *E. coli* serotype O26:B6.
- The values obtained below the  $CMC_a$  point out to the presence of pre-micelle oligomers at these LPS concentrations.
- Above the  $CMC_a$ , the increase of LPS concentration results in more aggregates, without any change on their dimensions.

ferent aggregate geometry above the  $CMC_a$ .

- Our data strongly suggests that future in vitro studies with this LPS strain should be carried out below and above the  $CMC_a$ , in order to distinguish between the pathological effects of the two different supramolecular structures.
- The search for drugs that interact with the aggregates and change the  $CMC_a$  value could be a new way to overcome certain bacterial-endotoxin-related pathologies.