



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Faculdade de Ciências da Saúde

**Utilização da Triptase como Marcador de
Prognósticos em doentes com Gamopatias
Monoclonais**

Diana Stefanía Faria Bicho

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biomédicas
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Cândida Ascensão Teixeira Tomaz
Co-orientador: Dr. Paulo Manuel Tavares Ratado

Covilhã, 22 de Junho de 2011

Agradecimentos

Porque ao longo da vida o nosso caminho se cruza como o de várias pessoas que nos ajudam a crescer quer como pessoas quer como profissionais, este espaço é dedicado a todos aqueles que participaram directa ou indirectamente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais por todo o carinho, amor e confiança que sempre me deram e que em muito contribuíram pela pessoa que sou hoje.

Aos meus orientadores Dra. Cândida Tomaz e Dr. Paulo Tavares pelos ensinamentos que me proporcionaram, pela paciência e supervisão do trabalho, bem como pela oportunidade de estágio no Hospital Sousa Martins.

Queria também agradecer à Dra. Patrícia Fonseca e as Técnicas Graça e Aldina pela ajuda, atenção, simpatia e disponibilidade sempre demonstrada ao longo destes meses, bem como a todos os funcionários do Serviço de Patologia Clínica, técnicos, administrativos, auxiliares e restante pessoal pela colaboração activa.

Agradeço à Phadia® pela amável cedência dos reagentes para quantificação da proteína triptase bem como a quantificação da IgE específica para os alérgenos inalantes.

Por fim e não menos importante à Joana e ao Steve por todo o estímulo, paciência e amizade que sempre me dedicaram e incentivaram ao longo desta etapa da minha vida.

A todos, um grande e sincero OBRIGADO!

Diana Bicho

Resumo

As Gamopatias Monoclonais (GM) são um grupo de doenças associado à hiperprodução monoclonal de células plasmocitárias na medula óssea, as quais produzem uma quantidade anormal de uma imunoglobulina monoclonal ou apenas fragmentos desta, usualmente IgA ou IgG. O Mieloma Múltiplo (MM), um dos tipos mais comuns e mortíferos de GM, constitui aproximadamente 10 % das neoplasias hematológicas. Encontra-se fundamentado que os mastócitos (MC) se encontram intimamente associados ao processo de angiogénese tumoral, assumindo esta especial importância na formação e crescimento de tumores, entre eles o MM. Assim, a angiogénese da medula óssea e as contagens de MC encontram-se altamente correlacionados em doentes com Gamopatia Monoclonal de Significado Indeterminado e em doentes com MM activo e não activo. A triptase, libertada por mastócitos (MC) após desgranulação, estimula a proliferação das células endoteliais vasculares humanas, promove a formação do tubo vascular em culturas e também degrada a matriz do tecido conjuntivo para providenciar espaço para o crescimento neovascular. A triptase desempenha ainda uma função autócrina já que a sua libertação pelos MC leva à desgranulação dos MC adjacentes, providenciando uma amplificação do sinal. A triptase tem sido vastamente utilizada como indicador do número e da activação de MC e, mais recentemente, como marcador de prognóstico em diversas doenças, tais como a mastocitose sistémica e reacções anafilácticas. Pelo referido, justifica-se a necessidade de apresentar um método não invasivo que ajude no diagnóstico das GM. Deste modo, o principal objectivo deste estudo foi a avaliação da triptase como potencial marcador independente para as GM. Os 304 participantes neste estudo foram recrutados na Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda e foram divididos em dois grupos: um grupo controlo composto por amostras de 77 indivíduos adultos sem GM e por um grupo teste formado por amostras de 229 indivíduos seleccionadas na seroteca do Serviço de Patologia Clínica, a partir do proteinograma por apresentarem suspeita de GM. Cada um destes grupos foi depois dividido em dois subgrupos: atópicos e não atópicos. Os resultados mostraram a existência de diferenças estatisticamente significativas na concentração de triptase para os indivíduos atópicos e não atópicos do grupo controlo e nos indivíduos não atópicos com e sem GM. Também se verificaram diferenças significativas entre os níveis séricos de triptase nos indivíduos não atópicos do grupo teste que apresentavam GM do tipo IgM e IgG. Por último, observaram-se diferenças significativas na concentração de IgE específica para aeroalergénios nos indivíduos atópicos com e sem GM. Deste modo foi possível verificar uma relação entre a atopia e os níveis séricos de triptase nos indivíduos sem GM e a existência de um efeito inibitório dos clones tumorais sobre os MC afectando os níveis de triptase nos indivíduos do grupo teste. Os resultados sugerem que a triptase, apesar do seu papel na neoangiogénese, não parece constituir um marcador diferencial no prognóstico das GM nos indivíduos atópicos.

Palavras-chave

Gamopatas monoclonais, plasmócitos, atopia, angiogénese tumoral, inflamação, medulograma, triptase, mastocitose sistémica, reacções anafilácticas.

Abstract

The Monoclonal Gammopathies (GM) are a group of diseases associated with overproduction of monoclonal plasma cells in bone marrow, which produce an abnormal amount of monoclonal immunoglobulin or just fragments of it, usually IgG or IgA. The Multiple Myeloma (MM), one of the most common and fatal of GM, is approximately 10% of hematologic malignancies. It is reasoned that the mast cells (MC) are closely associated with the process of tumor angiogenesis, therefore assuming particular importance in the formation and growth of tumors, including MM. Thus, bone marrow angiogenesis and MC counts are highly correlated in patients with Monoclonal Gammopathy of Undetermined Significance and MM patients with active and not active disease. The tryptase released by mast cells (MC) after degranulation, stimulates the proliferation of human vascular endothelial cells, promotes vascular tube formation in cultures and also degrades the connective tissue matrix to provide space for neovascular growth. The tryptase also plays an autocrine role since its liberation by the MC leads to adjacent MC degranulation providing a signal amplification. The tryptase has been widely used as an indicator of the number and activation of MC and, more recently, as a prognostic marker in several diseases such as systemic mastocytosis and anaphylactic reactions. Taking into account the need of a noninvasive method that helps in the diagnosis of GM, the main objective of this study was the evaluation of tryptase as a potential independent marker for GM. The 304 participants in this study were recruited from the Local Health Unit (ULS) of the Guarda and were divided into two groups: a control with samples from 77 adults with no GM and a study group with samples of 229 individuals selected at serotec of Clinical Pathology Laboratory. This group was selected based on suspected GM protein profile. Each of these groups was then divided in atopic and nonatopic individuals. The results showed statistically significant differences in the concentration of tryptase for atopics and nonatopics of control group and for non-atopic individuals with and without GM. There were also significant differences between serum tryptase levels in non-atopic study group with IgM and IgG GM. Finally, there were significant differences in the concentration of specific IgE to aeroallergens in atopic individuals with and without GM. It was observed a relationship between atopy and serum tryptase levels in patients without GM and the existence of inhibitory effect of tumor clones in MC affecting the levels of tryptase in the study group subjects. Despite the role of tryptase in neoangiogenesis, this protein does not seem to be a differential marker in the prognosis of GM at least for atopic individuals.

Key- words

Monoclonal gammopathys, plasma cells, atopy, tumor angiogenesis, inflammation, boné marrow examination, tryptase, systemic mastocytosis, Anaphylactic *reactions*.

Índice

Introdução	1
1. Sistema Imunitário	2
1.1 Células efectoras do sistema imunitário	3
2. Gamopatias Monoclonais	8
2.1 Diagnóstico das Gamopatias Monoclonais	11
2.1.1 Avaliação Clínica e Laboratorial	12
2.1.1.1 Electroforese de proteínas	12
2.1.1.2 Imunofixação/Imunosubtração	13
2.1.1.3 Quantificação de Imunoglobulinas	14
2.1.1.4 Determinação de lesões ósseas por Imagiologia	15
2.1.1.5 Medulograma	15
3. Triptase	16
3.1 Triptase na Anafilaxia	17
3.2 Triptase nos processos tumorais	18
Materiais e Métodos	20
1. População em estudo	21
1.1 Grupo Controlo	21
1.2 Grupo Teste	21
2. Colheita e conservação das amostras	21
3. Parâmetros analíticos	21
3.1 Parâmetros bioquímicos	22
3.1.1 Quantificação da IgA, IgG, IgM, Kappa e Lambda	22
3.1.2 Imunosubtração: Quantificação da componente monoclonal	22
3.1.3 Proteínas totais	23
3.2 Parâmetros imunológicos	23
3.2.1 Triptase	23
3.2.2 Quantificação para a IgE específica para alergénios inalantes (Phadiatop®)	24

4. Análise estatística	24
Resultados e conclusões	25
1. Caracterização da População	26
1.1 Caracterização do Grupo Controlo	27
1.2 Caracterização do Grupo Teste	28
2. Comparação dos valores de concentração de triptase para indivíduos atópicos e não atópicos dentro do grupo controlo	31
2.1 Comparação dos valores de concentração de triptase nos indivíduos atópicos sem Gamopatias Monoclonais	31
3. Comparação dos valores de concentração de triptase para indivíduos atópicos e não atópicos dentro do grupo teste	33
4. Comparação entre o grupo teste e o grupo controlo	33
4.1 Comparação dos valores de concentração de triptase em indivíduos atópicos com e sem gamopatias monoclonais	33
4.2 Comparação dos valores de concentração de triptase em indivíduos não atópicos com e sem gamopatias monoclonais	34
4.3 Comparação entre a concentração de IgE específico para aeroalergénios em indivíduos atópicos com e sem gamopatias monoclonais	35
5. Variação dos níveis séricos de triptase em função do tipo de gamopatia monoclonal em indivíduos atópicos e não atópicos	35
6. Correlação entre a concentração de triptase e a concentração de cadeias pesadas das imunoglobulinas nos indivíduos atópicos e não atópicos com gamopatias monoclonais	39
7. Correlação entre a concentração de triptase e a razão kappa/lambda livres nos indivíduos atópicos e não atópicos com gamopatias monoclonais	40
8. Correlação entre as concentrações de triptase e da componente monoclonal em indivíduos com gamopatias monoclonais	41
Discussão e Conclusões	44
Perspectivas Futuras	48
Referências Bibliográficas	50

Lista de Figuras

Figura 1 - Imunidade Adaptativa [3].	2
Figura 2 - Esquema de diferenciação dos plasmócitos e transformação maligna [4].	4
Figura 3 - Representação esquemática do possível papel do aumento dos MC no estroma de certos tumores. Os MC podem recrutar quimioatractores derivados de tumores para secretar moléculas selectivamente que beneficiam o desenvolvimento tumoral; estas podem incluir factores de crescimento, histaminas que são mitigénicas e imunossupressoras, agentes de neovascularização como a heparina, VEGF e IL-8 bem como as protéases que permitem a formação de novos vasos e expansão de metástases [29].	7
Figura 4 - Proteinograma do soro de um indivíduo saudável VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade; LDL - Lipoproteína de baixa densidade; AAG - α 1 glicoproteína acídica; ATT - α 1 antitripsina; α 2-M - α 2-macroglobulina [45].	13
Figura 5 - Representação de dois proteinogramas: A - pico monoclonal em região beta-globulina; B - pico monoclonal em região gama-globulina, caso mais comum [31].	13
Figura 4 - Radiografia e ressonância magnética da coluna lombar com fractura em L4 [31].	15
Figura 5 - Aspirado da medula óssea que mostra plasmócitos do mieloma múltiplo, observa-se o citoplasma corado de azul, núcleo excêntrico e pálido na zona perinuclear (ou auréola) [50].	16
Figura 6 - Estrutura tetramérica da triptase que revela os quatros monómeros [57].	17
Figura 7 - Representação hipotética da histamina e da triptase madura no soro ou plasma durante uma reacção de anafilaxia. O nível máximo está representado como 100%, na realidade varia dependendo da gravidade clínica do estímulo de anafilaxia que, por sua vez, afecta qual a taxa de detecção da triptase [61].	18
Figura 8 - Fluxograma do estudo dos grupos controlo e grupo teste em estudo, onde UA representa unidades de anticorpos alergénio-específico. Ph ⁺ : Phadiatop positivo; Ph ⁻ : Phadiatop negativo; Ph 1: Phadiatop 1; Ph 10: Phadiatop 10; Ph >100: Phadiatop superior a 100.	26

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Caracterização da população em função do sexo.	27
Gráfico 2 - Caracterização da população em função da atopia.	27
Gráfico 3 - Caracterização do grupo controlo em função do sexo.	28
Gráfico 4 - Caracterização do grupo controlo em função da atopia.	28
Gráfico 5 - Caracterização do grupo teste em função do sexo.	29
Gráfico 6 - Caracterização do grupo teste em função da atopia.	29
Gráfico 7 - Caracterização do grupo teste segundo o tipo de gamopatias monoclonal. GK: IgG/Kappa, GL: IgG/Lambda, MK: IgM/Kappa, ML: IgM/Lambda, AK: IgA/Kappa, AL: IgA/Lambda e C. livres: kappa e lambda livres.	30
Gráfico 8 - Grupo de indivíduos com gamopatias monoclonais relativamente ao formato do pico monoclonal.	30
Gráfico 9 - Concentração média de triptase (ng/mL) em indivíduos atópicos e não atópicos do grupo controlo. * nível de significância	31
Gráfico 10 - Distribuição dos indivíduos atópicos sem GM em função dos grupos etários estudados.	32
Gráfico 11 - Concentração média de triptase nos grupos de atópicos e não atópicos do grupo teste.	33
Gráfico 12 - Concentração média de triptase no grupo de atópicos com e sem GM.	34
Gráfico 13 - Concentração média de triptase nos grupos de indivíduos não atópicos com e sem GM.	34
Gráfico 14 - Concentração média de IgE específica para aeroalregénios nos grupos de atópicos com e sem GM.	35
	36

Gráfico 15 - Mediana de triptase em função dos tipos de GM para indivíduos não atópicos. GK: IgG/Kappa, GL: IgG/Lambda, MK: IgM/Kappa, ML: IgM/Lambda, AK: IgA/Kappa, AL: IgA/Lambda e C. livres: kappa e lambda livres. Os números que aparecem junto aos asteriscos e círculos representam os valores extremos, estando numerados pela ordem correspondente à base de dados. 36

Gráfico 16 - Medianas de triptase em função dos tipos de GM para indivíduos atópicos. GK: IgG/Kappa, GL: IgG/Lambda, MK: IgM/Kappa, AK: IgA/Kappa, AL: IgA/Lambda e C. livres: kappa e lambda livres. O número que aparecem junto ao círculo representam o valor extremo, estando numerado pela ordem correspondente à base de dados. 36

Gráfico 17 - Concentração média de triptase (ng/mL) em função dos tipos de GM em relação às cadeias de imunoglobulinas para indivíduos atópicos e não atópicos. 38

Gráfico 18 - Concentração média de triptase em função dos tipos de GM de cadeias leves para indivíduos atópicos e não atópicos. 39

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Gamopatias monoclonais malignas.	9
Tabela 2 - Doenças associadas às Gamopatias Monoclonais [10].	10
Tabela 3 - Sistemas de estadiamento do mieloma múltiplo [41].	11
Tabela 4 - Concentrações médias de triptase (ng/mL) nos grupos de indivíduos de atópicos seleccionados consoante o risco de atopia.	33
Tabela 5 - Concentração média de triptase (ng/mL) para cada um dos tipos de GM do grupo teste. A negrito são evidenciadas as concentrações mínima e máxima de triptase.	37
Tabela 6 - Concentração média de triptase (ng/mL) para cada um dos tipos de GM de cadeia pesada do grupo teste.	38
Tabela 7 - Concentrações médias de triptase (ng/mL) para cada um dos tipos de GM de cadeias leves do grupo teste.	39
Tabela 8 - Concentrações médias de imunoglobinas com os respectivos valores de referência e valores da concentração média de triptase para indivíduos <u>não atópicos</u> .	40
Tabela 9 - Concentrações médias de imunoglobinas com os respectivos valores de referência e valores da concentração média de triptase para os indivíduos <u>atópicos</u> .	40
Tabela 10 - Razão kappa/lambda livres com respectivos valores de referência e valores da concentração média de triptase para o grupo de indivíduos <u>não atópicos</u> .	41
Tabela 11 - Razão kappa/lambda livres com respectivos valores de referência e valores da concentração média de triptase para o grupo de indivíduos <u>atópicos</u> .	41
Tabela 12 - Concentrações média de triptase e valores da concentração média de CM para cada um dos grupos relativos ao formato do pico do proteinograma (três afiados: pequeno, médio, alto e um largo) para os indivíduos <u>não atópicos</u> .	42
Tabela 13 - Concentração média de triptase e valores da concentração média de CM para cada um dos grupos relativos ao formato do pico do proteinograma (três afiados: pequeno, médio, alto e não afiado) para os indivíduos <u>atópicos</u> . * O grupo com pico afiado alto apenas possui um indivíduo, pelo que não é possível estabelecer uma correlação nem estimar o SEM. A [CM]= 2,09 e [triptase]= 1,32 ng/mL.	42
Tabela 14 - Concentração média de triptase e valores da concentração média de CM	42

para os grupos com pico afiado e pico não afiado para os indivíduos não atópicos.

Tabela 15 - Concentração média de triptase e valores da concentração média de CM para os grupos com pico afiado e pico não afiado para os indivíduos atópicos.

43

Lista de Acrónimos

AK	Gamopatias monoclonais IgA Kappa
AL	Gamopatias monoclonais IgA Lambda
AL	Amiloidose
BCR	Receptor da célula B
BCT	Receptor da célula T
CM	Componente Monoclonal
EGF	Factor de crescimento endotelial
FcεR	Receptor de elevada afinidade para o IgE
FEIA	Imunoensaio fluorezimático
FGF-2	Factor de crescimento de fibroblastos-2
GK	Gamopatias monoclonais IgG Kappa
GL	Gamopatias monoclonais IgG Lambda
GM	Gamopatias monoclonais
GMSI	Gamapatia monoclonal de significado indeterminado
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-8	Interleucina 8
MC	Mastócitos
MC _T	Mastócitos triptase positivos
MC _{TC}	Mastócitos triptase e quimase positivos
MHC	Complexo major de histocompatibilidade
MK	Gamopatias monoclonais IgM Kappa
ML	Gamopatias monoclonais IgM Lambda
MM	Mieloma Múltiplo

MW	Macroglobulinemia de Waldenström
NGF	Factor de crescimento de necrose
PDGF	Factor de crescimento derivado das plaquetas
SCF	Factor das células estaminais
SEM	Erro padrão da média
TGF- β	Factor de crescimento transformante
UA	Unidades de anticorpos alergenico-especificos

Introdução
Materiais e Métodos
Resultados
Discussão e Conclusões
Perspectivas Futuras
Referências Bibliográficas

1. SISTEMA IMUNITÁRIO

O sistema imunitário (SI) é composto por células, moléculas solúveis e tecido linfóide e compreende todos os mecanismos através dos quais um organismo multicelular se defende de invasores externos como vírus, bactérias, protozoários e fungos. Também é responsável pela eliminação de células “do próprio” onde a função biológica se encontra alterada. Todos os seus componentes contribuem para uma resposta imunológica efectiva e bem organizada de modo a preservar o equilíbrio funcional. Os precursores das células imunitárias encontram-se na medula óssea e o processo de formação, desenvolvimento e maturação de elementos sanguíneos a partir de células estaminais (células indiferenciadas pluripotentes) é denominado de hematopoiese [1].

O SI tem dois componentes, o inato e adaptativo. O sistema inato é composto por mecanismos de defesa não-específicos, sem memória e reage sempre da mesma maneira aos mesmos estímulos, constituindo uma resposta indiferenciada ao agente invasor. Esta capacidade inespecífica inclui células que fagocitam vários tipos de microrganismos e compreende a primeira linha de defesa do organismo. Por outro lado, a imunidade adquirida (adaptativa) reconhece uma grande variedade de antígenos, sendo por isso específica, tem memória e inclui os linfócitos que aumentam a eficácia da resposta e reconhecem especificamente o agente patogénico invasor. A imunidade inata potencia os principais aspectos da resposta adaptativa [2].

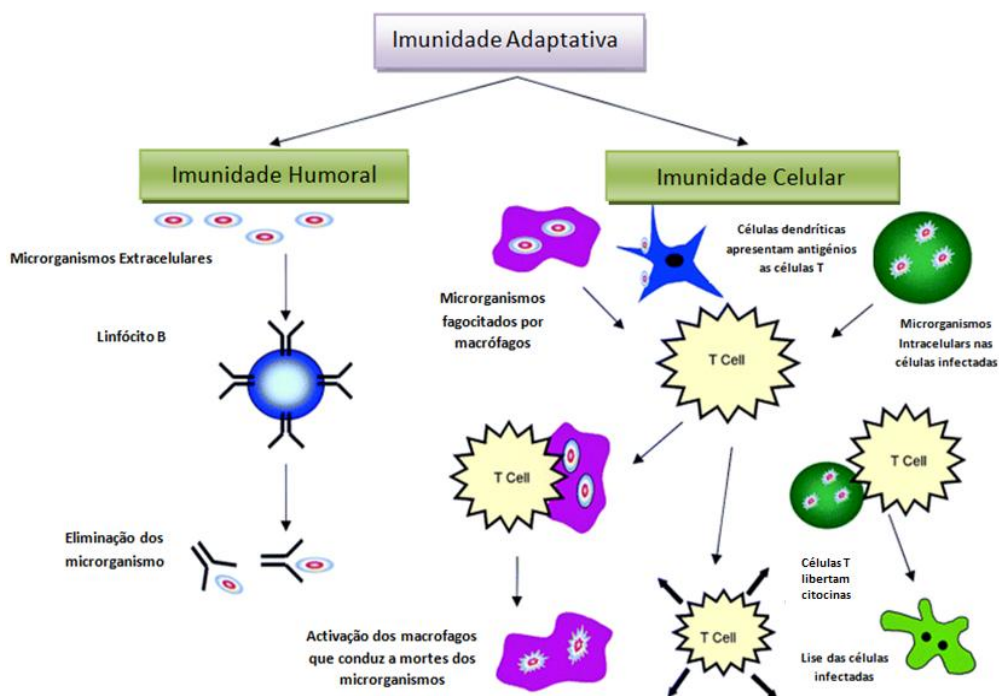


Figura 1 - Imunidade Adaptativa [3].

A imunidade adaptativa (Figura 1) compreende os mecanismos de resposta imunológica, humorais e celulares. A imunidade humoral baseia-se na diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos, os quais produzem anticorpos. Também os linfócitos T juntamente com as células dendríticas são responsáveis pela eficácia da produção de anticorpos. Estes tipos de células são importantes na apresentação antigénica [3].

Os linfócitos ocupam um papel central no sistema imunitário uma vez que conferem especificidade nas respostas imunitárias. Existem duas grandes famílias de linfócitos: linfócitos B e linfócitos T, os quais apresentam várias diferenças funcionais [1].

1.1 CÉLULAS EFECTORAS DO SISTEMA IMUNITÁRIO

Os linfócitos T são originados a partir de precursores hematopoiéticos da medula óssea mas a sua maturação ocorre no timo. Expressam um receptor da célula T (TCR) o qual apenas reconhece antígenos que sofreram um processamento prévio. O TCR é apresentado à superfície de células associadas a moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC). Estas células são responsáveis pela eficácia da resposta imunitária. Por outro lado, os linfócitos B no indivíduo adulto são produzidos na medula óssea e caracterizam-se por expressarem à superfície um receptor da célula B (BCR) que reconhece antígenos nativos solúveis ou por cooperação com os linfócitos T. O objecto de actuação dos linfócitos B é a produção de anticorpos e diferenciação em plasmócitos. Os linfócitos B são responsáveis pela resposta humoral (anticorpos), um componente vital da imunidade adaptativa que confere protecção de longo prazo contra uma série de agentes infecciosos ou outros [1].

A activação e diferenciação dos linfócitos B (figura 2), leva à produção de plasmócitos, que funcionam como fábricas especializadas na síntese e exportação de imunoglobulina solúveis (Ig) ou anticorpos [1]. Os plasmócitos são células linfóides com aspecto ovóide [4]. Assim, os plasmócitos e os anticorpos são os mediadores finais das respostas humorais da imunidade adaptativa.

Sob condições normais, o organismo produz plasmócitos apenas para combater infecções e uma vez que a infecção tenha sido eliminada os plasmócitos são eliminados. Eventos oncogénicos como translocações nos genes das imunoglobulinas; instabilidades cariotípicas e mutações somáticas podem fazer com que os plasmócitos tenham uma proliferação anormal, dividindo-se uma e outra vez, formando eventualmente um tumor (por exemplo as Gamopatias Monoclonais GM). Estes plasmócitos anormais, chamadas células do mieloma, são células cancerígenas que produzem um tipo específico de anticorpos [5]. O tumor formado surge principalmente na medula óssea, mas devido à migração dos plasmócitos poderá infiltrar-se noutros órgãos. À medida que se desenvolve o mieloma, os plasmócitos tornam-se detectáveis no sangue podendo disseminar para múltiplos locais do organismo originando o mieloma múltiplo [6]. Os plasmócitos no mieloma são fenotipicamente diferentes

dos seus homólogos normais em virtude da ausência de CD19 ou presença de CD56 [7]. Todos os plasmócitos tumorais apresentam um rearranjo e mutações idênticas dos genes variáveis das Ig (Vh) e assim, produzem uma proteína idêntica (proteína monoclonal), a qual pode ser detectada numa electroforese sérica como um pico estreito e afiado na fracção γ [8].

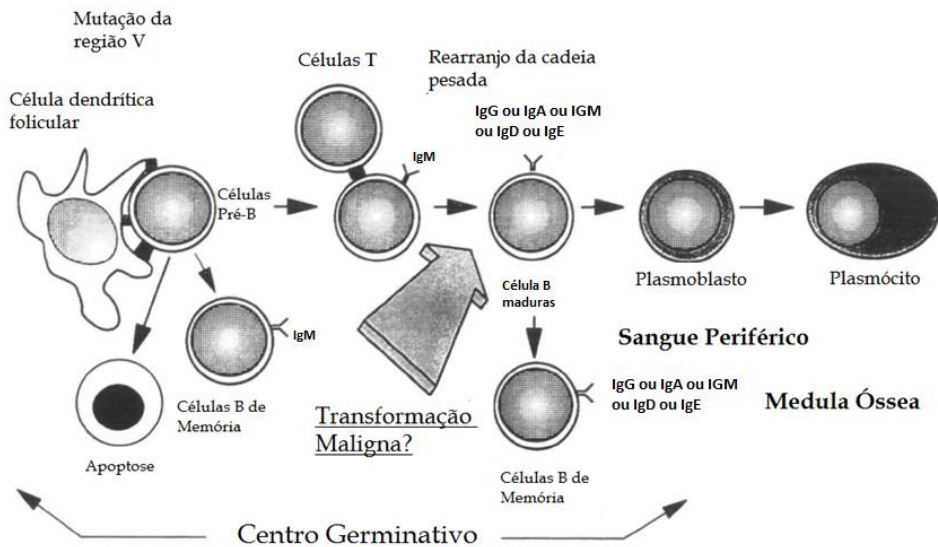


Figura 2 - Esquema de diferenciação dos plasmócitos e transformação maligna [8].

As Ig são estruturalmente compostas por subunidades designadas por cadeias pesadas e cadeias leves. Cada Ig é constituída por duas cadeias polipeptídicas pesadas (H) idênticas e duas cadeias polipeptídicas leves (L) também iguais entre si. As cadeias leves são denominadas kappa (κ) e lambda (λ) e cinco isótipos de cadeias pesadas (α , δ , ϵ , γ e μ) permitem distinguir cinco classes de Ig: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM [9, 10]. As cadeias leves consistem em dois domínios de tamanho aproximadamente igual: o domínio constante (C) que apresenta uma variação reduzida de uma Ig e o domínio variável (V) que apresenta uma sequência de aminoácidos hipervariável [11].

As proteínas monoclonais, também denominadas de componente monoclonal ou paraproteínas resultam da proliferação de um clone de plasmócitos, produtor de fragmentos de Ig ou unidades completas de um determinado isotipo [12]. Por sua vez, Ig policlonais são anticorpos heterogêneos formados por vários clones de linfócitos B, produzidos contra agentes invasores. Na presença de GM, resultantes da transformação maligna de células B, há a produção e secreção de uma proteína monoclonal. Elevadas quantidades de componente monoclonal irão reprimir ou bloquear a produção das Ig, nos outros clones de linfócitos. Assim sendo, esta situação patológica leva ao desenvolvimento de imunodeficiências com o aumento do número de infecções.

As Ig desempenham várias funções no organismo sendo as principais apresentadas a seguir:

- Neutralização do agente agressor;
- Opsonização/Fagocitose;
- Activação do complemento;
- ADCC (citotoxicidade dependente de anticorpos);
- Desgranulação de mastócitos e basófilos e/ou eosinófilos [1].

Os mastócitos (MC) são considerados células granuladas encontradas no estroma, sendo especial e abundantemente localizadas sob as superfícies epiteliais. São células multifuncionais que apresentam a capacidade de produzir histamina, citocinas, metabolitos do ácido araquidónico (prostaglandinas e leucotrienos), factores quimiotáticos e proteinases específicas [13]. Com base na composição dos grânulos secretores das proteases, distinguem-se dois tipos de MC: os triptase positivos (MC_T) e os MC duplamente triptase e quimase positivos (MC_{TC}). Os MC_T são encontrados na superfície das mucosas e alvéolo pulmonar, enquanto os MC_{TC} predominam no líquido sinovial, pele, tracto gastrointestinal, tecidos subcutâneos e tiróide [14]. São células derivadas de uma célula progenitora específica na medula óssea e migram para os tecidos onde maturam consoante as condições microambientais, bem como da imunidade inata e adaptativa [15, 16].

Os MC são células importantes da imunidade inata, capazes de fagocitar microrganismos e produzir grandes quantidades de mediadores inflamatórios que têm um papel importante no recrutamento de leucócitos para o local da inflamação [1].

Os MC expressam receptores de elevada afinidade para a IgE do tipo I ($Fc\epsilon RI$) e do tipo III ($Fc\epsilon RIII$) no início do seu desenvolvimento, antes de exibir grânulos maduros e poderem ser reconhecidos morfologicamente [14]. A activação dos MC pode ser iniciada como resultado da interacção de antigénios multivalentes (alergénios) com o anticorpo específico IgE ligado à membrana celular. A ligação cruzada de duas moléculas contíguas de IgE inicia a activação dos MC e leva à libertação dos grânulos (desgranulação).

Os MC são tidos em conta como os “parasitas” intervenientes nas reacções de hipersensibilidades mediadas por IgE. Estas células encontram-se nas mucosas, lugar privilegiado para entrar em contacto com qualquer alergénio que as atravesse [1]. A descoberta da estreita ligação entre a IgE e os MC sugere que os eventos subjacentes a qualquer condição mediada por IgE, como por exemplo a doença alérgica, sejam pelo menos em parte, atribuíveis aos MC [17].

As alergias consistem numa reacção exagerada do sistema imunitário devido à exposição de alergénios, o que conduz a uma produção aumentada de IgE específica por parte dos linfócitos B activados. Por sua vez, a atopia é uma tendência pessoal e/ou familiar para produzir anticorpos IgE em excesso, em resposta a uma exposição a alergénios inalantes [1]. Estudos epidemiológicos sobre a sensibilização a alergénios baseados numa população e no

âmbito industrial demonstram que a propensão de incidência de atopia tende a diminuir com a idade. No entanto, a atopia é uma doença complexa que envolve a interacção entre diversos sistemas fisiológicos, como por exemplo a pele, pulmões, mucosas e sistema imunitário [18].

Anafilaxia, reacção alérgica aguda, pode ser causada por vários alérgenos, sendo os mais frequentes: medicamentos, picadas de insectos, certos alimentos e injeções de imunoterapia alérgica [19]. A inflamação produzida nestas reacções contribui para o recrutamento de MC, a sua activação como consequência da exposição alérgica conduz à desgranulação e incita as células a libertar histamina, heparina, triptase entre outras substâncias [20]. Como resposta, as vias respiratórias dos pulmões podem fechar-se e provocar asfixia; os vasos sanguíneos podem dilatar-se e fazer com que a tensão arterial diminua; as paredes dos vasos sanguíneos podem deixar sair líquido, provocando edema e urticária. O coração pode apresentar um funcionamento anormal batendo de forma irregular e bombeando sangue de forma inadequada. O indivíduo pode assim entrar em estado de choque [21].

A triptase é uma protease cujos níveis totais no soro aparecem elevados neste tipo de reacções alérgicas e a sua quantificação pode ser feita entre 15 a 180 minutos após o início da reacção. No entanto, existem excepções, por exemplo em anafilaxia por alimentos, onde os níveis de triptase raramente se encontram elevados uma vez que existe predominância de basófilos em relação aos mastócitos [22].

A desgranulação pode acontecer por outros estímulos que não a ligação à IgE, como por exemplo: o anião superóxido, parasitas, bactérias patogénicas, enterotoxinas e moléculas do complemento [13, 14]. Os MC expressam o receptor c-kit que liga ao factor de crescimento células estaminais (SCF) provocando interacções vitais para o crescimento e desenvolvimento dos MC. A existência de mutações no gene c-kit é associada à mastocitose sistémica na qual se verifica um aumento do número de MC nos tecidos [13]. Estudos recentes têm mostrado que o SCF produzido pelas células tumorais *in vivo* tem sido implicado na acumulação dos MC na periferia dos tumores. A super-expressão de SCF no desenvolvimento de tumores mamários aumenta a acumulação de MC no local de crescimento do tumor, enquanto a sua inibição resulta não só na diminuição da acumulação dos MC, como na diminuição da angiogénese [23].

Os MC acumulam-se na fronteira entre o tecido saudável e o maligno e expressam muitos compostos pro-angiogénicos que podem desempenhar um papel importante na angiogénese tumoral juntamente com outras células mielóides, pelo que estão muitas vezes associados a um mau prognóstico (figura 3) [20]. Estudos têm demonstrado que o número de MC_T e a neurovascularização mostram um aumento semelhante com a progressão do cancro cervical [24], adenocarcinoma pulmonar [25] e o linfoma maligno [26]. Exames histopatológicos e observações clínicas de tumores sólidos e de malignidades hematológicas

têm demonstrado que os MC são a chave alvo na infiltração tumoral, associados a neoangiogénese e ao crescimento tumoral. Existem várias evidências de que o número de mastócitos varia com a progressão do tumor [20]. No entanto, estas células também remodelam a matriz extracelular durante o processo de cicatrização, função que é subvertida no crescimento tumoral promovendo a disseminação do tumor e metástases [20, 27]. As metaloproteínas existentes nos MC facilitam a invasão tumoral e alteram o equilíbrio na comunicação entre o epitélio e o tecido conectivo (estroma) [28]. Os MC promovem o desenvolvimento tumoral através das seguintes acções:

- (a) Perturbando a comunicação entre o estroma e o epitélio;
- (b) Facilitando a angiogénese tumoral;
- (c) Libertando factores de crescimento;
- (d) Induzindo a um estado de imunossupressão [29].

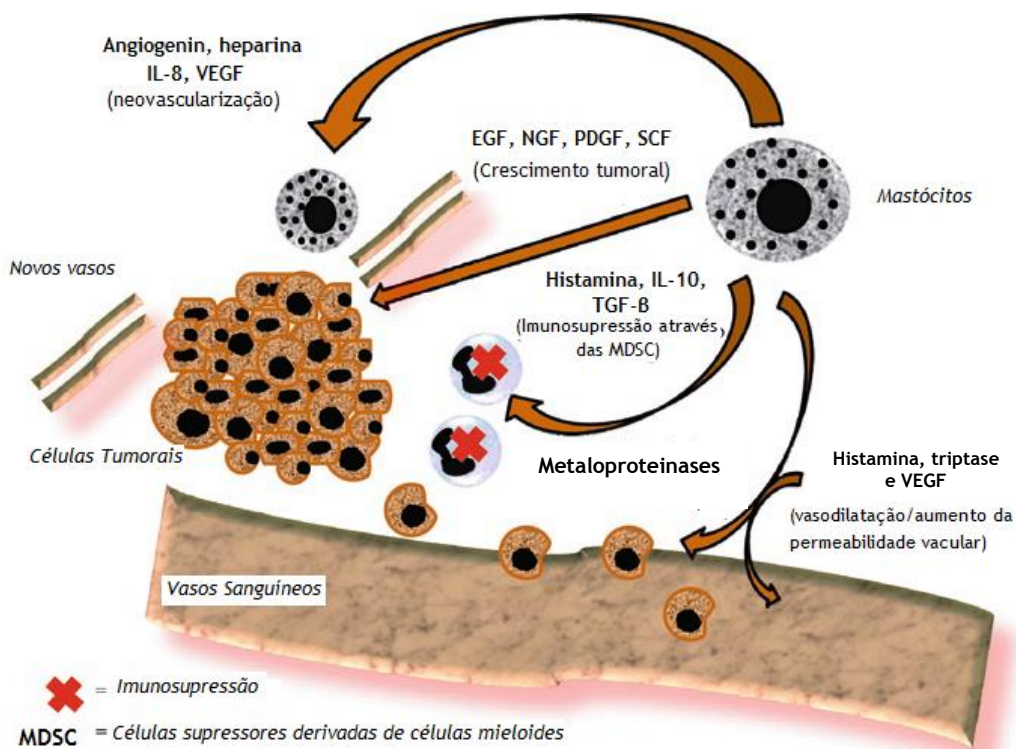


Figura 3 - Representação esquemática do possível papel do aumento dos MC no estroma de certos tumores. Os MC podem recrutar quimioatratores derivados de tumores para secretar moléculas selectivamente que beneficiam o desenvolvimento tumoral; estas podem incluir factores de crescimento, histaminas que são mitogénicas e imunossupressoras, agentes de neovascularização como a heparina, VEGF e IL-8 bem como as proteases que permitem a formação de novos vasos e expansão de metástases [29].

A triptase libertada pelos MC após desgranulação, estimula a proliferação das células endoteliais vasculares humanas, promove a formação do tubo vascular em culturas e também degrada a matriz do tecido conjuntivo para providenciar espaço para o crescimento neovascular. A triptase desempenha ainda uma função autócrina já que a sua libertação pelos

MC leva à desgranulação dos MC adjacentes, providenciando uma amplificação do sinal a qual está envolvida em processos inflamatórios, na coagulação do sangue, entre outros [30].

2. GAMOPATIAS MONOCLONAIS

O mieloma múltiplo, um dos tipos mais comuns e mortíferos de gamopatias monoclonais (GM), constitui aproximadamente 10 % das neoplasias hematológicas e requer a detecção de pelo menos 10 % de plasmócitos na medula óssea, a detecção de componente monoclonal no soro e/ou urina e a detecção de evidências de dano noutros órgãos [31]. As GM também denominadas de paraproteinemias, disproteínemias ou imunoglobulinopatias, referem a condição na qual existe uma hiperprodução monoclonal de células plasmocitárias na medula óssea, as quais produzem uma quantidade anormal de um tipo de proteína chamada imunoglobulina monoclonal ou apenas fragmentos desta, usualmente IgA ou IgG [32, 33]. São mais comumente encontradas em indivíduos acima dos 50 anos, sendo que, o risco de desenvolvimento da doença aumenta com a progressão da idade. Pesquisas sugerem o aparecimento predominante em homens relativamente às mulheres e tendo a sua prevalência aumentada em africanos relativamente aos caucasianos [10].

Encontra-se fundamentado que os mastócitos se encontram intimamente associados ao processo de angiogénese tumoral, assumindo especial importância na formação e crescimento de tumores, entre eles o mieloma múltiplo. Assim, a angiogénese da medula óssea (avaliada como a área de micro-vasos) e as contagens de mastócitos encontram-se altamente correlacionados em doentes com GM de significado indeterminado e em doentes com mieloma múltiplo activo e não activo, e ambos estes parâmetros se encontram, simultaneamente, aumentados no mieloma múltiplo activo [30].

As GM podem reflectir um processo patológico maligno ou ser benignas. O mieloma múltiplo (MM), a amiloidose (AL), a macroglobulinemia de Waldenström (MW), o plasmocitoma, doença das cadeias pesadas e doença de cadeias leves são as principais gamopatias monoclonais malignas (tabela 1). Na maioria das situações a expansão monoclonal de plasmócitos é considerada benigna, denominando-se gamopatia monoclonal de significado indeterminado (GMSI) [34]. As manifestações clínicas destas patologias apresentam uma grande variabilidade, podendo ir de um indivíduo assintomático até uma associação de vários sinais e sintomas inespecíficos com envolvimento de vários órgãos [10]. Por esses motivos, as gamopatias monoclonais, principalmente as GMSI são pouco diagnosticadas. Apesar de serem entidades assintomáticas, actualmente está demonstrado que apresentam um risco de progressão de 1% por ano para MM, AL, MW e outras gamopatias malignas [35].

Tabela 16 - Gamopatias monoclonais malignas.

Tipo de GM	Características	Diagnóstico	Ref.
Amiloidose (AL)	Acumulação de fibrila amilóide (fragmento da cadeia leve de Ig) que afecta vários órgãos, nomeadamente, rim, coração, pulmões, nervos periféricos, pele, língua e intestino. Os sintomas que apresenta são fadiga, edema, perda de peso.	Presença de proteína monoclonal no soro ou na urina e manifestações de infiltração na medula óssea. Na albuminúria, cardiopatia, hepatomegalia e neuropatia periférica poderá ser feita uma biopsia com posterior análise histológica com vermelho Congo, que mostra o aspecto "fluorescente" da proteína amilóide.	[7, 10]
Plasmocitoma ósseo (PSO)	Desenvolvimento de células do mieloma confinadas à medula óssea e osso, costuma atingir principalmente e coluna torácica causando dor lombar e sinais de compressão medular	Realização de uma biopsia; avaliação radiológica através de tomografia computadorizada ou a ressonância magnética para avaliar a extensão da lesão.	[6, 10, 31]
Plasmacitoma Solitário Extramedular (PSE)	Desenvolvimento das células do mieloma em tecidos moles como massa extramedular. São principalmente encontrados na região da cabeça e pescoço afectando principalmente as vias aéreas. A sintomatologia consiste em epítaxis, rinorreia e obstrução nasal-	A extensão da lesão é delineada recorrendo a tomografia computadorizada ou a ressonância magnética enquanto a biopsia permite definir o diagnóstico.	[7, 31]
Plasmocitoma solitário múltiplo	Desenvolvimento de células do mieloma em vários tecidos que incluem quer tecido moles, quer tecido ósseo. Os sintomas variam consoante o locais afectados.	Utilização de técnicas radiológicas e biopsia.	[7]
Macroglobulinemia de Waldenström (MW)	Transtorno linfoproliferativo de fenotipo B caracterizado pela infiltração de um linfoma linfoplasmocitoide na medula óssea e pela síntese de IgM monoclonal. Causa hiperviscosidade, sangramento de mucosas, hipercalemia, dor óssea e perda de peso	Para além da presença de infiltração medular e da concentração de IgM que estão presentes noutras desordens linfoproliferativas deve fazer-se um estudo fenotípico.	[10]
Doença de Depósito de Cadeia Leve	Patologia infiltrativa, do grupo das paraproteinemias, caracterizada pela presença de material amorfo monoclonal em diversos tecidos, constituído por fragmentos de cadeias leves, sobretudo Kappa. Afecta principalmente a função renal.	Análise histológica da amostra recolhida por biopsia com vermelho de Congo a qual não apresentar coloração nem estrutura fibrilar quando examinada por microscopia electrónica.	[36-38]
Doença de Cadeias Pesadas	Patologia rara de carácter proliferativo, doença neoplásica caracterizada pela superprodução de imunoglobulinas monoclonais de cadeia pesada. Apresenta-se sob a forma de edema, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia e/ou linfadenopatia abdominal que causam dor abdominal.	Electroforese de proteínas ou da urina para a visualização das cadeias pesadas sob a forma incompleta ou truncada.	[39]

Apesar dos grandes avanços da compreensão da patogénese das GM e aplicação de novas modalidades terapêuticas nos últimos anos, o mieloma permanece uma doença incurável, com sobrevida média de três anos. Assim, um dos grandes desafios do tratamento, além de prolongar a sobrevida dos pacientes, é evitar complicações e o seu impacto na qualidade de vida [31]. A variabilidade deste tipo de doença torna imprescindível a caracterização de diversas formas clínicas com base em manifestações clínicas e propedêutica laboratorial, de modo a permitir:

- i) Melhor diagnóstico diferencial;
- ii) Estadiamento da patologia;
- iii) Obtenção de informações sobre o prognóstico;
- iv) Escolha e aplicação da terapêutica mais eficaz;
- v) Monitorização da eficácia do tratamento [10].

Torna-se indispensável a diferenciação das GM das gamopatias policlonais, uma vez que as primeiras são neoplásicas ou potencialmente neoplásicas e as segundas resultam de processos inflamatórios ou infecciosos [37].

Vários estudos mostram que as GM podem estar associadas a diversas outras doenças, uma vez que, a componente monoclonal tem sido citada em várias patologias sendo por isso necessário afastar causas reaccionais [10, 40]. Na tabela 3, encontram-se as principais patologias associadas às GM.

Tabela 2 - Doenças associadas às Gamopatias Monoclonais [10].

HEMATOLÓGICAS	Linfomas, leucemia linfóide e mielóide crónica, doença de Von Willebrand adquirida e doença de Gaucher, síndrome do anticorpo antifosfolípido, anemia perniciosa, Aplasia pura de série vermelha, Mielodisplasia, etc.
REUMATOLÓGICAS	Artrite reumatóide, Lupus Eritematoso Sistémico, etc.
NEUROLÓGICAS	Neuropatia Sensoriomotora Periférica, Miastenia Gravis, Polirradiculoneuropatia Crónica Inflamatória Desmielinizante e Ataxia Telangiectasia.
DERMATOLÓGICAS	Escleroderma de Bushke, Pioderma Gangrenoso, Xantogranuloma Necrobiótico, Xantomatose Plana, Micose Fungóide, entre outros.
IMUNOSSUPRESSORAS	SIDA e pós-transplante (associado a Citomegalovirus).
MISCELÂNEA	Infecção por <i>Helicobacte rpylori</i> , Hepatite Crónica Activa, Cirrose biliar primária, Angioedema adquirido tipo II, etc.

Antes do planeamento do tratamento torna-se necessário determinar o estágio e classificar o prognóstico para cada doente. Actualmente existem 2 sistemas principais de estratificação dos doentes com MM: o sistema de Durie-Salmon e o sistema internacional de classificação (tabela 2). O sistema de estadiamento proposto por Durie e Salmon (1975) é utilizado em todo o mundo, apesar de, actualmente, existirem novos sistemas que não foram aceites universalmente. O sistema Durie-Salmon combina vários factores relacionados com a massa tumoral pela combinação de cinco factores (calcémia, hemoglobina, proteína monoclonal, proteinúria e lesões ósseas), no entanto, não é capaz de estimar adequadamente o tempo de sobrevivência global. Em 2005, o Grupo Internacional do Mieloma da Fundação Internacional do Mieloma desenvolveu um novo sistema de estadiamento, mais simples, mais confiável, mais consistente e mais reprodutível, para uma melhor correlação clínica e

estratificação de subgrupos com diferentes evoluções. Este sistema baseia-se no doseamento sérico da microglobulina (β_2m) e da albumina [10, 41, 42].

Tabela 3 - Sistemas de estadiamento do mieloma múltiplo [41].

ESTÁDIO	SISTEMA DE ESTADIAMENTO DURIE-SALMON	MEDIDA DA MASSA CELULAR ($\times 10^{12}/m^2$)	SISTEMA DE ESTADIAMENTO INTERNACIONAL
I (A ou B)	Todos os seguintes: Hb > 10g/dL; Cálcio normal ou < 5,25mEq/dL; Baixa taxa de produção do componente M IgG < 5g/dL; IgA < 3 g/dL Proteína urinária monoclonal < 4g/24h Ausência ou lesão óssea única pelo que o raioX aparece normal ou apenas com plasmocitoma ósseo solitário	Pequena massa de células: < 0.6	β_2m < 3,5 mg/dL Albumina \geq 3,5mg/dL
II (A ou B)	Não cumpre os critérios do Estadio I nem do Estadio III, é um intermediário entre estes dois	Massa de células intermédia: 0.6 - 1.2	β_2m < 3,5 mg/dL Albumina \geq 3,5mg/dL ou β_2m : 3,5 - 5,5 mg/dL independente da albumina
III (A ou B)	Pelo menos um dos seguintes critérios: Hb < 8,5g/dL; Cálcio > 12mg/dL; IgG > 7g/dL; IgA > 5 g/dL Proteína urinária monoclonal > 12g/24h Múltiplas lesões osteolíticas, fracturas.	Elevada massa celular: > 1.2	β_2m > 5,5 mg/dL

Para além desta classificação segundo estádios, existem também duas subclassificações que caracterizam a função renal:

- Subclassificação A: Função renal relativamente normal.
(valor de creatinina sérica < 2,0 mg/dl)
- Subclassificação B: Função renal anormal.
(valor de creatinina sérica > 2,0 mg/dl) [43].

2.1 DIAGNÓSTICO DAS GAMOPATIAS MONOCLONAIS

O processo diagnóstico do conjunto de patologias denominadas por GM é multidisciplinar e, como tal, requer uma avaliação clínica e laboratorial para se poder determinar o estágio em que a doença se encontra. Assim, no diagnóstico das GM estipularam-se três passos principais:

- 1) Detecção e quantificação da proteína monoclonal;
- 2) Exame de medula óssea para verificação da presença ou ausência de infiltração medular por plasmócitos

3) Pesquisa de lesão a nível orgânico (hipercalcemia, anemia, insuficiência renal e lesões ósseas).

2.1.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA E LABORATORIAL

A avaliação clínico-laboratorial consiste num exame clínico cuidadoso com o intuito de encontrar fragilidade óssea e consequentes lesões ósseas, e massas tumorais. Observa-se também a presença de palidez, fraqueza e equimoses, podendo apresentar ainda sinais neurológicos relacionados com a compressão da medula óssea [35, 44]. Também existem alguns parâmetros bioquímicos para avaliar a função renal, creatinina e ureia e nível de cálcio. Deve-se fazer um hemograma completo para avaliar a presença/gravidade da anemia, a contagem de glóbulos brancos e de plaquetas.

2.1.1.1 ELECTROFORESE DE PROTEÍNAS

A separação electroforética das proteínas séricas é uma técnica universal de triagem para a presença de componente monoclonal para a detecção das GM e complemento no diagnóstico de estados patofisiológicos associados à variação na quantidade de proteínas. A análise das proteínas do soro por electroforese é utilizada para estudar e monitorizar, não apenas para as malignidades das células B, mas também noutro mecanismos imunológicas e, em menor extensão, avalia a resposta inflamatória. A figura 4 representa um proteinograma normal com o significado de cada um dos picos [45].

A electroforese capilar baseia-se na separação das proteínas pelo seu tamanho e outras propriedades físico-químicas, através do fluxo num tubo capilar. O método é semelhante à HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance), que utiliza colunas similares à agarose, fornecendo resultados comparáveis à electroforese em gel de agarose. Na electroforese capilar a separação electroforética é feita em meio líquido, de acordo com as suas respectivas cargas eléctricas e peso molecular das várias proteínas, através da dissociação dos grupos ácidos no soluto a pH constante. A análise proteica é usualmente realizada em soluções livres com tampões alcalinos, de modo a minimizar as interacções com as paredes dos capilares e faz uso das forças electroforéticas e electroendosmóticas das proteínas [33, 45].

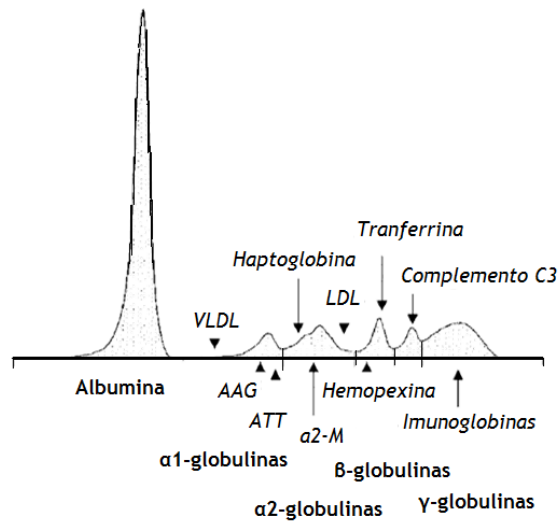


Figura 4 - Proteinograma do soro de um indivíduo saudável VLDL - Lipoproteína de muito baixa densidade; LDL - Lipoproteína de baixa densidade; AAG - α 1 glicoproteína ácida; ATT - α 1 antitripsina; α 2-M - α 2-macroglobulina [45].

Devido à sua alta resolução, a electroforese capilar permite a separação de bandas pouco visíveis no método convencional. As fracções anormais nos diagramas electroforéticos (Figura 5), principalmente as que se encontram nas zonas das β ou γ -globulinas, são sempre suspeitas de serem proteínas monoclonais e, conseqüentemente, uma indicação da existência de GM. Estudos clínicos demonstram uma maior sensibilidade da electroforese capilar (93 a 95%) para a detecção de GM, em relação à electroforese por zona em gel de agarose [37].

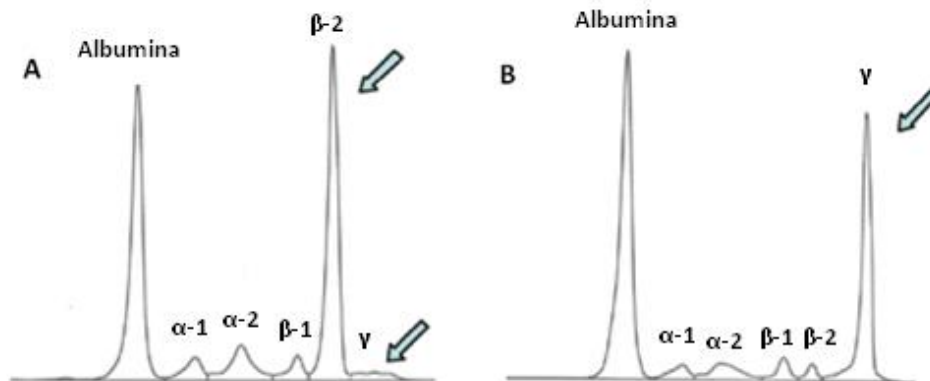


Figura 5 - Representação de dois proteinogramas: A - pico monoclonal em região beta-globulina; B - pico monoclonal em região gama-globulina, caso mais comum [31].

2.1.1.2 IMUNOFIXAÇÃO/IMUNOSUBTRAÇÃO

O principal objectivo da imunofixação é definir o tipo de proteína anormal presente na amostra, identificando as cadeias leves e pesadas envolvidas e confirmar a sua presença. Esta técnica consiste na identificação imunológica dos componentes monoclonais do soro

humano. A identificação da componente monoclonal (CM) é essencial para o diagnóstico, o prognóstico, o tratamento e a avaliação da eficácia do tratamento das GM. Para além disso, também permite realizar diagnóstico diferencial com as gamopatias policlonais, o que é importante visto as primeiras estarem associadas a processos malignos ou potencialmente malignos enquanto as gamopatias policlonais estão mais frequentemente relacionadas a processos inflamatórios ou reactivos, que regridem espontaneamente [46].

Este método permite remover uma classe ou tipo específico de imunoglobulina de uma amostra sérica utilizando o suporte sólido que está agregado a um ligante para a imunoglobulina específica. Na imunosubtração de electroforese capilar, a imunotipagem é caracterizada pela reacção do soro com anticorpos específicos para a identificação das fracções anormais que aparecem no diagrama electroforético. A amostra de soro está exposta a cinco suportes sólidos diferentes, cada um contendo um anticorpo específico da imunoglobulina. Três destes suportes sólidos são específicos de cadeias pesadas (IgG, IgA e IgM) e os outros dois estão dirigidos para cada uma das cadeias leves Kappa e Lambda. Após a exposição aos suportes sólidos, a amostra é submetida à electroforese onde as gamaglobulinas específicas são identificadas no electrograma através da ausência do respectivo pico em relação ao padrão de referência (SPE) [47].

2.1.1.3 QUANTIFICAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS

Para a determinação da concentração das diversas imunoglobulinas (IgA, IgM e IgG) é utilizada a técnica de nefelometria cinética. Esta quantificação define o grau de envolvimento da proteína monoclonal identificada além de estabelecer a relação kappa/lambda, o que permite a identificação do tipo de GM apresentada pelo doente.

A determinação da imunoglobulina A é um auxiliar no diagnóstico de patologias do metabolismo das proteínas e de baixa resistência a agentes infecciosos. Representa 15-20% das imunoglobulinas do soro humano e é encontrada predominantemente nas secreções: saliva, lágrima, leite, mucosas do trato gastrointestinal, trato respiratório e genito-urinário. Por outro lado, a IgG perfaz 80% das imunoglobulinas do organismo e encontra-se igualmente distribuída nos compartimentos extracelulares e é a única que atravessa a placenta. É o anticorpo principal nas respostas imunes secundárias. A sua determinação no soro e noutros líquidos corporais é um auxiliar no diagnóstico de doenças auto-imunes, sarcoidose, doença hepática crónica, infecções crónicas e recorrentes, doenças malignas do tecido linfóide, mieloma múltiplo e diversas imunodeficiências mistas graves. Comparativamente, a IgM constitui cerca de 10% do conjunto de imunoglobulinas, sendo principalmente encontrada o nível intravascular, a sua quantificação auxilia no diagnóstico de patologias do metabolismo das proteínas e de baixa resistência a agentes infecciosos. Por outro lado, as cadeias Kappa e Lambda leves são utilizadas no diagnóstico e tratamento de diversas doenças que incluem doenças hepáticas e renais graves, mieloma múltiplo e outras patologias associadas às proteínas sanguíneas.

2.1.1.4 DETERMINAÇÃO DE LESÕES ÓSSEAS POR IMAGIOLOGIA

As técnicas imagiológicas permitem avaliar a presença, gravidade e localização de qualquer área de lesão óssea. Estima-se que cerca de 25% dos doentes diagnosticados não apresentam anomalias radiológicas, porém desenvolvem-nas durante o curso da doença. A tomografia computadorizada e a ressonância magnética nuclear podem ser utilizadas em situações específicas, por possuírem maior sensibilidade e especificidade na detecção de lesões ósseas pequenas e localizadas, uma vez que, a radiografia convencional só detecta osteólise, quando cerca de 30% de substância óssea trabecular foi perdida [37, 48].

A radiografia continua a ser o exame padrão para verificar lesões ósseas causadas pelo mieloma (figura 6). É necessário fazer uma pesquisa radiográfica completa do esqueleto, para detectar lesões de mieloma; a finalidade é demonstrar perda ou enfraquecimento do osso (osteoporose ou osteopenia, por causa da destruição óssea motivado pelo mieloma), lesões líticas e/ou qualquer fractura ou colapso do osso.



Figura 6 - Radiografia e ressonância magnética da coluna lombar com fractura em L4 [31].

2.1.1.5 MEDULOGRAMA

Este procedimento é uma das práticas cirúrgicas mais antigas e consiste na extracção de medula óssea a partir da crista ilíaca postero-superior ou antero-posterior. O aspirado da medula óssea demonstra a presença de plasmócitos atípicos, porém a percentagem varia significativamente na dependência do sítio e da qualidade do material aspirado. Apenas em 6% dos casos a biópsia da medula óssea é capaz de demonstrar a infiltração medular [49]. Este teste é importante para determinar a percentagem de células de mieloma que se infiltraram na medula.

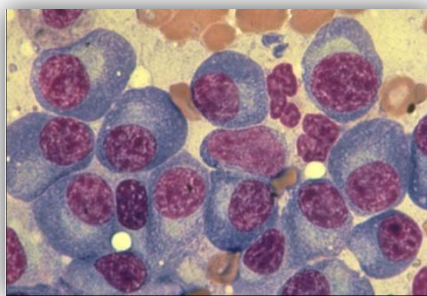


Figura 7 - Aspirado da medula óssea que mostra plasmócitos do mieloma múltiplo. Observa-se o citoplasma corado de azul, núcleo excêntrico e pálido na zona perinuclear (ou auréola) [50].

O medulograma detecta doenças como leucemias, infecções e parasitoses, através da visualização directa no microscópio. Esta técnica é considerada como a ferramenta de diagnóstico mais valiosa para desordens hematológicas [51]. O conteúdo do aspirado medular é primeiramente utilizado para uma avaliação citológica com análise morfológica e contagem diferencial das células. Outras amostras poderão ser utilizadas noutro tipo de testes, nomeadamente estudos moleculares, citogenéticos, cultura microbiológica, imunohistoquímica e citometria de fluxo [52].

3. TRIPTASE

A triptase tem sido vastamente utilizada como indicador do número e da activação de MC e, mais recentemente, como marcador de prognóstico em diversas doenças, tais como a mastocitose sistémica e reacções anafilácticas e como marcador das células neoplásicas nas leucemias mielóides [53].

A triptase é uma protease de serina tetramérica neutra com um peso molecular de 134kDa que existe abundantemente nos mastócitos e, em menor concentração, noutras linhagens celulares como os basófilos [54]. Esta protease é constituída por 4 subunidades ligadas não covalentemente, e por um centro activo tal como se pode ver na figura 8 [55]. Existe sob duas formas principais, as α -triptases que se dividem em $\alpha 1$ e $\alpha 2$ -triptase e as β -triptases que podem ser classificadas em $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ -triptase. Estas duas formas possuem sequências idênticas numa percentagem de aproximadamente 90%, sendo que, a sua heterogeneidade resulta da glicosilação na ligação N-terminal [55, 56]. A triptase possui a especificidade da tripsina, hidrolisa ligações peptídicas no terminal carboxílico dos resíduos básicos e também é capaz de ligar à heparina, sendo libertada como um complexo com este proteoglicado. A triptase cliva o fibrinogénio, activa a collagenase e a matriz de

metaloproteinases latentes, hidrolisa alguns neuropéptidos e pode causar secreção do muco [13].

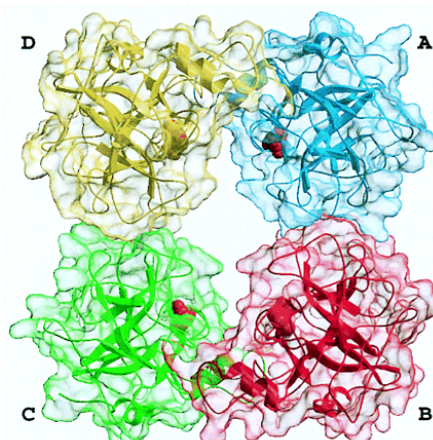


Figura 8 - Estrutura tetramérica da triptase que revela os quatros monómeros [57].

O mecanismo responsável pela regulação da triptase é incerto uma vez que esta enzima tetramérica resiste aos inibidores biológicos das serina-protéases, uma vez que o seu centro activo está direccionado num poro central, o qual restringe o acesso a uma grande quantidade de substratos e inibidores de protéases [58]. No entanto, pensa-se que a regulação pode ser feita, em parte, quando proteínas básicas, como a antritrombina III, dissociam a triptase da heparina [59].

3.1 TRIPTASE NA ANAFILAXIA

A concentração total de triptase no soro aumenta gravemente na presença de reacções de anafilaxia. Esse aumento é frequentemente relacionado com o aumento dos níveis de histamina [60]. No entanto, nem todos os tipos de reacções hipotensivas, que clinicamente parecem ser de anafilaxia, estão associados a níveis elevados de triptase madura. Em vítimas de alérgenos alimentares que induzem anafilaxia, muitas vezes não mostram activação das triptase maduras, o que aumenta a probabilidade dos ocorridos eventos não ser dependentes da activação dos mastócitos [59]. Um incremento transitório do nível de triptase em circulação depois de um doente sofrer uma reacção anafiláctica ajuda a identificar e avaliar o grau da reacção. Uma maior especificidade no diagnóstico da anafilaxia, pode ser obtido através da quantificação da β -triptase para além da triptase total. Esta discriminação é particularmente útil quando a anafilaxia ocorre na mastocitose sistémica, na qual os níveis de triptase tendem a aumentar [60].

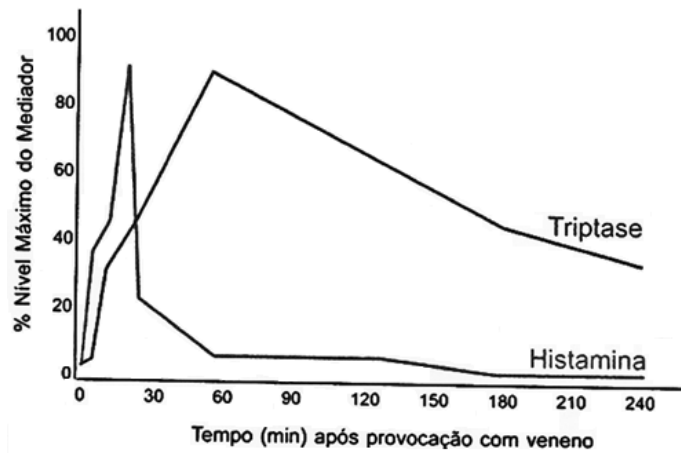


Figura 9 - Representação hipotética da histamina e da triptase madura no soro ou plasma durante uma reacção de anafilaxia. O nível máximo está representado como 100%, na realidade varia dependendo da gravidade clínica do estímulo de anafilaxia que, por sua vez, afecta qual a taxa de detecção da triptase [61].

Nas reacções de anafilaxia os níveis de β -triptase (detectados através de imunoenaios de triptase madura) estão elevados na maioria dos indivíduos. Apesar da β -triptase ser libertada pelos mastócitos em paralelo com a histamina, a triptase difunde-se através dos tecidos mais lentamente do que a histamina. Tal como se pode verificar através da figura 9, os níveis de β -triptases na circulação atingem o seu máximo entre os 15 e os 60 minutos após o estímulo que provocou a reacção. A histamina atinge o seu pico máximo aos 5 min e entra logo em declínio acentuado até os 30 min, após este tempo entra em declive mais lento até os 60 min e atinge a linha base [61].

3.2 TRIPTASE NOS PROCESSOS TUMORAIS

A angiogénese é o crescimento de novos vasos a partir de uma pequena microcirculação pré-existente. É um processo natural e importante para vários processos fisiológicos normais como a cicatrização [62] e o desenvolvimento da placenta [63]. No entanto, também acontece em condições patológicas como o desenvolvimento de tumores [64], retinopatia diabética [65], artrite reumatóide [66, 67], mastocitose [68] e outras desordens inflamatórias. O processo da angiogénese é constituído por múltiplos passos que incluem, para além do surgimento dos vasos, a migração celular, a proliferação e a sua sobrevivência. Este processo inicia-se com a degradação dos componentes da membrana por acção de proteases o que permite as células do endotélio penetrar e migrar dentro da matriz extracelular e depois proliferar. No estágio final, as células do endotélio alinham-se sobre si próprias formando capilares ou estruturas tipo tubos que irão originar uma anastomose (rede de canais) [14].

Os MC intervêm em muitas situações que dependem da angiogénese, como o crescimento tumoral e a reparação de tecidos. Muitos mediadores dos MC são angiogénicos e

regulam a proliferação das células estaminais. Os factores de crescimento das células estaminais (SCF), do endotélio vascular (VEGF), da epiderme (EGF), dos fibroblastos (FGF) e o derivado das plaquetas (PDGF) induzem a migração e proliferação dos MC nos locais de neovascularização. Os produtos da desgranulação dos MC, como a triptase, também degradam a matriz de tecido conjuntivo, de modo a providenciar espaço para a formação dos novos vasos [14, 25, 69]. A triptase juntamente com a heparina induzem a formação de estruturas capilares e de células endoteliais pela activação de metaloproteinases e do plasminogénio activador que degradam a matriz extracelular com libertação de factores de crescimento ou exercendo influência directa nas células endoteliais, enquanto a histamina promove a proliferação das células endoteliais dos capilares [25, 58].

Ao longo deste capítulo, foram apresentadas várias evidências que demonstram que a indução de novos vasos sanguíneos relaciona-se intimamente com os MC e a triptase, tudo isto graças ao facto de diversos mediadores dos MC como a triptase serem angiogénicos e regularem a proliferação e função das células endoteliais. Na literatura está descrita a utilização da triptase como marcador tumoral nas mielodisplasias, mas não existem dados bibliográficos para as GM. Assim sendo, com o presente estudo pretendeu-se avaliar a utilização da triptase como marcador independente para as GM. Para isso, procedeu-se à selecção de dois grupos, o grupo teste seleccionado a partir de proteinogramas com suspeita de GM e o grupo controlo seleccionado através dos valores de concentração da IgE específica para os aeroalergénios subdividido em atópicos (com três níveis de risco de atopia) e não atópicos. No grupo teste procedeu-se a quantificação da concentração de triptase e a IgE específica para alergénios inalantes, enquanto no grupo controlo apenas foi quantificada a concentração da triptase.

No primeiro passo procedeu-se à comparação da concentração de triptase em relação à atopia quer para o grupo teste quer para o grupo controlo. De seguida, comparou-se a concentração de triptase para os indivíduos atópicos e não atópicos com e sem GM. Posteriormente avaliaram-se as concentrações de triptase para os vários tipos de GM e por fim, tentou-se estabelecer correlação entre os parâmetros: concentração de Ig, componente monoclonal e razão kappa/lambda livres com a concentração de triptase.

Introdução
Materiais e Métodos
Resultados
Discussão e Conclusões
Perspectivas Futuras
Referências Bibliográficas

1. POPULAÇÃO EM ESTUDO

Os 304 participantes neste estudo foram recrutados na Unidade Local de Saúde (ULS) da Guarda que integra o Hospital Sousa Martins, o Hospital Nossa Senhora da Assunção e o agrupamento de centros de saúde da Guarda.

1.1 GRUPO CONTROLO

O grupo controlo é composto por amostras de 77 indivíduos adultos sem GM da ULS da Guarda, oriundos da consulta de alergologia, os quais foram seleccionados a partir dos seus valores de IgE específica para alérgenos inalantes comuns, tendo sido constituídos dois grupos dentro deste: atópicos e não atópicos. Dentro dos indivíduos atópicos foram ainda considerados três grupos, tendo em consideração os valores de IgE específicos para os aeroalérgenos para aproximadamente 1 kUA/L (0,85-1,45), 10 kUA /L (10,0-13,5) e superiores a 100 kUA /L (100,0-850,0). Também foi quantificada a concentração plasmática de triptase.

1.2 GRUPO TESTE

O grupo teste é formado por amostras de 229 indivíduos oriundos da consulta de ORL e Pneumologia, seleccionadas na seroteca do Serviço de Patologia Clínica, por apresentarem suspeita de GM, com base principalmente no estudo do proteinograma.

2. COLHEITA E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

A colheita das amostras de sangue total foi feita num tubo com activador de coagulação, os quais foram centrifugados a 5000rpm durante 5min à temperatura de 2-8°C. O soro obtido foi utilizado para as quantificações bioquímicas e imunológicas e foi armazenado a -80°C.

3. PARÂMETROS ANALÍTICOS

Os valores de todo os parâmetros analíticos foram previamente validados pelos resultados do controlo de qualidade diária e pelo programa de validação externa da qualidade.

3.1 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

3.1.1 QUANTIFICAÇÃO DA IGA, IGG, IGM, KAPPA E LAMBDA

A quantificação da IgA, IgG, IgM, Kappa e Lambda foi realizada por nefelometria cinética (Image, BeckmanCoulter®). No método utilizado as Ig formam com o antisoro específico um complexo insolúvel, produzindo turbidez, cuja intensidade aumenta a absorvência que é proporcional a concentração de Ig na amostra. É uma técnica que mede o grau de turvação de um meio originada pela presença, nesse meio, de pequenas partículas que o tornam opticamente não homogêneo. É um fenómeno físico que avalia o aumento da luz dispersa que é dirigida numa outra direcção que não a da luz incidente.

O protocolo utilizado foi o indicado pelos fabricantes e incluiu os reagentes referidos em seguida. Como solução de lavagem usou-se solução salina tamponada de Ácido capso (3-(Ciclohexilamino)-2-hydroxi-1-propanosulfónico de sódio) e como tampão solução salina tamponada de fosfato com um potenciador de polímero e azida de sódio. Os reagentes incluíram ainda um diluente (solução salina tamponada de fosfato e azida de sódio), um calibrador e um cartucho de reagentes com anticorpo anti-imunoglobulina (soro de cabra processado), solução de excesso de antigénio (soro humano diluído e processado) e azida de sódio usada como conservante.

Os valores de referência utilizados para as Ig foram os seguintes: **IgA:** 82-453 mg/dL; **IgG:** 751-1560 mg/dL; **IgM:** 40-274 mg/dL; **Kappa:** 629-1350 mg/dL; **Lambda:** 313-723 mg/dL.

3.1.2 IMUNOSUBTRAÇÃO: QUANTIFICAÇÃO DA COMPONENTE MONOCLONAL

A quantificação da componente monoclonal foi realizada por imunossobstracção de electroforese capilar mediante a utilização do equipamento Capillarys, Sebia®. O método utilizado consiste na remoção de uma classe ou tipo específicos de Ig de uma amostra de soro, utilizando-se para isso um suporte sólido o qual está acoplado a um ligando para uma Ig específica. Na imunossobstracção da electroforese capilar, as amostras de soro diluídas são expostas a cinco suportes sólidos diferentes cada um contendo um ligando específico para Ig. As Ig específicas ou os fragmentos de Ig específicos são identificados no analisador automático pela ausência do respectivo pico relativamente ao padrão electroforético da electroforese capilar de proteínas.

O protocolo utilizado foi indicado pelos fabricantes e inclui os seguintes reagentes: a solução padrão de referência, um diluente da amostra, uma solução de lavagem e uma rack de reagentes com anticorpo anti-imunoglobulina (soro total de mamífero processado) para cada uma das três cadeias pesadas e leves (IgA, IgG, IgM, Kappa e Lambda).

O valor de referência considerado foi a inexistência de pico monoclonal.

3.1.3 PROTEÍNAS TOTAIS

Para esta quantificação procedeu-se a aplicação de um ensaio colorimétrico utilizando o equipamento Cobas 6000, Roche®. Este ensaio permite a determinação da concentração das proteínas totais através da medição do aumento da absorvência do complexo de biureto de cor púrpura formado em solução alcalina quando o cobre bivalente reage com as ligações das proteínas ($proteína + Cu^{2+} \xrightarrow{sol. alcalina} Complexo Cu-proteína$). A intensidade cromática medida é directamente proporcional à concentração de proteínas.

O protocolo aplicado nesta quantificação foi o recomendado pelos fabricantes e inclui os reagentes referenciados a seguir. Como calibrador foi utilizada a solução f.a.s., os controlos de qualidade Precinorm® U e Precipath® U e uma Cassete Cobas® Hitachi Alkaline Phosphate. As soluções de trabalho consistiram em dois reagentes: R1 (2-amino-2-metil-1-propanol: 1,724mol/L, pH 10,44, acetato de magnésio 3,83 mmol/L, sulfato de zinco 0,766 mmol/L, ácido N-(2-hidroxietil)-etilenediaminatriacético 3,83 mmol/L) e R2 (Fosfato de p-nitrofenilo 132,8 mmol/L, pH 8,44).

O intervalo de valores de referência considerado para as proteínas totais foi entre 6,4 - 8,3 g/dL.

3.2 PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS

3.2.1 TRIPTASE

A quantificação da proteína triptase foi feita com base no imunoensaio fluoroenzimático (FEIA) executado no equipamento ImmunoCAP 250, Phadia®. Este ensaio é um método de análise quantitativa em que os anticorpos anti-triptase (anticorpos monoclonais B12 e G4), ligados a uma fase sólida, reagem com a triptase (α e β triptase) presente no soro de cada doente. A quantidade de triptase ligada da amostra é determinada adicionando um anticorpo secundário (β triptase) conjugado com a enzima que irá formar um complexo. Após incubação, os anticorpos de triptase não ligados são removidos e o complexo ligado é incubado com um substrato fluorescente que vai reagir com o complexo proteína/anticorpo marcado com a enzima. A fluorescência emitida é directamente proporcional à concentração de anticorpos presente na amostra.

O protocolo aplicado seguiu as recomendações dos fabricantes, tendo sido utilizados os reagentes referidos em seguida. Um conjugado triptase; uma solução de lavagem e uma solução de desenvolvimento; o ImmunoCAP Tryptase; os calibradores e controlos.

O valor de referência utilizados para a triptase foi $< 1\text{ng/mL}$.

3.2.2 QUANTIFICAÇÃO DA IGE ESPECÍFICA PARA ALERGÉNIOS INALANTES (PHADIATOP®)

A quantificação da IgE específica para aeroalergénios utilizou o imunoensaio fluoroenzimático (FEIA) executado no equipamento ImmunoCAP 250, Phadia®. O teste baseia-se na reacção da IgE específica do soro com alergénios (inalantes) ligados covalentemente a uma fase sólida, o ImmunoCAP. Depois da lavagem das IgE's não específicas, anticorpos marcados com uma enzima anti-IgE são adicionados tendo em vista a formação de complexos. Após a incubação, são removidos os anticorpos anti-IgE marcados com a enzima não ligados e o complexo ligado é incubado com um agente revelador. Por fim, faz-se a paragem da reacção e depois mede-se a fluorescência do complexo sendo os resultados comparados com o calibrador.

O protocolo aplicado seguiu as recomendações dos fabricantes, tendo sido utilizados os reagentes referidos em seguida. Um conjugado de IgE específica, uma solução de lavagem e uma solução de desenvolvimento, o ImmunoCAP Phadiatop, calibradores e controlos.

O valor de referência considerado para indivíduos não atópicos foi $< 0,35\text{ ng/mL}$.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi efectuada uma análise estatística aos dados da população em estudo utilizando o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 18.0. Os dados foram expressos sob a forma de média \pm erro padrão da médias (SEM) e foram analisados mediante testes paramétricos e não paramétricos consoante violavam ou não os pressupostos normalmente impostos, nomeadamente a normalidade. Para avaliar as diferenças entre as médias de dois grupos de resultados independentes que não apresentavam distribuição normal utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Para comparações múltiplas de resultados de vários grupos usou-se o teste de Bonferroni. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados como estatisticamente significativos (95 % de índice de confiança).

Introdução
Materiais e Métodos
Resultados
Discussão e Conclusões
Perspectivas Futuras
Referências Bibliográficas

1. CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

Para uma melhor sistematização da metodologia em estudo, procedeu-se à sua representação através de um fluxograma (figura 10). A análise estatística foi feita sempre em relação à concentração de triptase em cada um dos grupos da população em estudo. Os padrões de diferenciação mais importantes nesta análise foram a atopia e as GM.

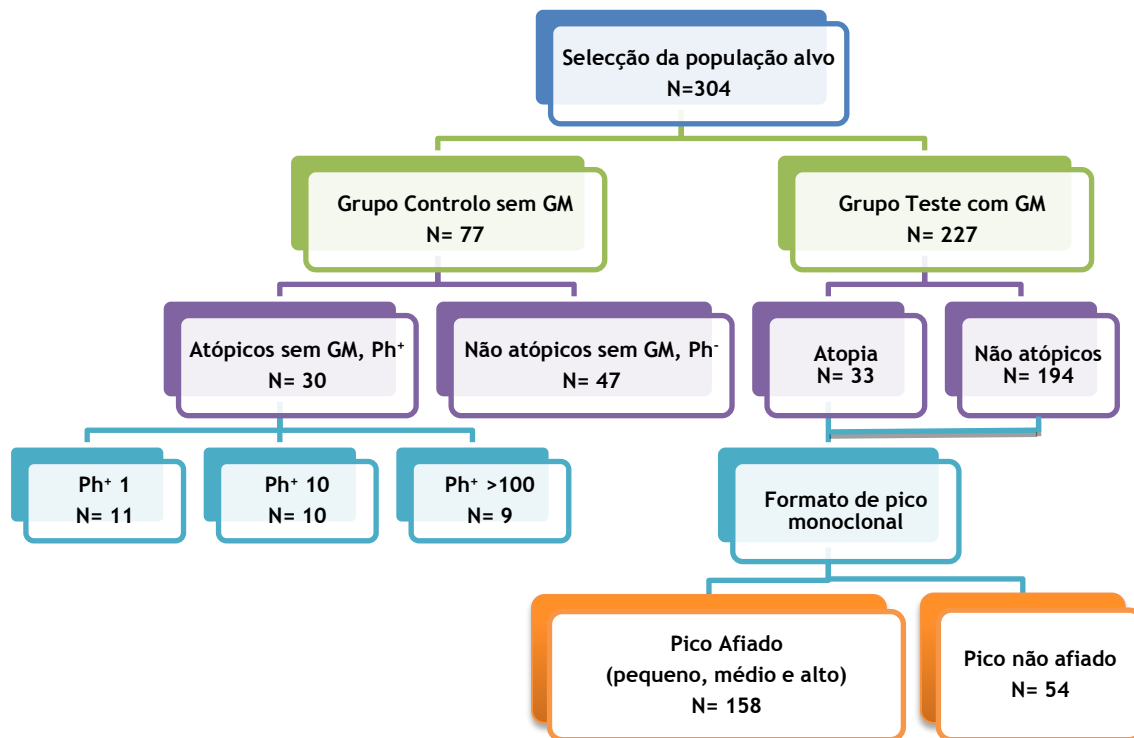


Figura10 - Fluxograma do estudo dos grupos controlo e grupo teste em estudo, onde UA representa unidades de anticorpos alérgico-específico. Ph⁺: Phadiatop positivo; Ph⁻: Phadiatop negativo; Ph⁺ 1: Phadiatop 1 (0,85-1,45) kUA/L; Ph⁺ 10: Phadiatop 10 (10,0-13,5) kUA/L; Ph⁺ >100: Phadiatop superior a 100 (100,0-850,0) kUA/L.

A população em estudo incluiu 304 indivíduos adultos, sendo 140 mulheres (46,1%) e 164 homens (53,9%), com idade compreendidas entre os 18 e os 100 anos, com uma média de 66,12 ± 19,71 anos (gráfico 1).

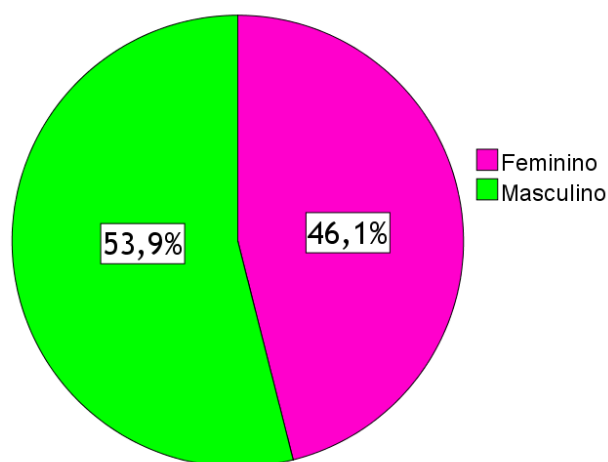


Gráfico 1 - Caracterização da população em função do sexo.

Os valores de IgE específica para alérgenos inalantes (Phadiatop®) variaram entre 0,01 e 850 kAU/L. Foram considerados atópicos todos os indivíduos cujos valores séricos de IgE específica foram superiores ao valor de referência (0,35 kUA/L). Assim, verifica-se através do gráfico 2 que 20,7% (63 dos 304 indivíduos) são atópicos e 79,3% são não atópicos (correspondentes a 241 em 304 indivíduos).

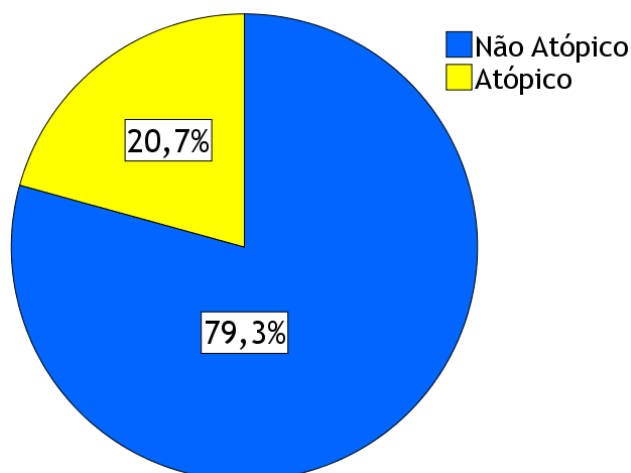


Gráfico 2 - Caracterização da população em função da atopia.

Tal como já foi referido, a população é constituída por dois grupos de estudo: o grupo controlo, sem GM e grupo teste com GM.

1.1 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO CONTROLO

O grupo controlo, sem GM, era constituído por 50 indivíduos do sexo feminino (64,9%) e 27 do sexo masculino (35,1%), sendo a média de idades de $39,36 \pm 14,94$ anos (gráfico 3). A faixa etária deste grupo é constituída apenas por indivíduos adultos e estende-se desde os 18 aos 73 anos.

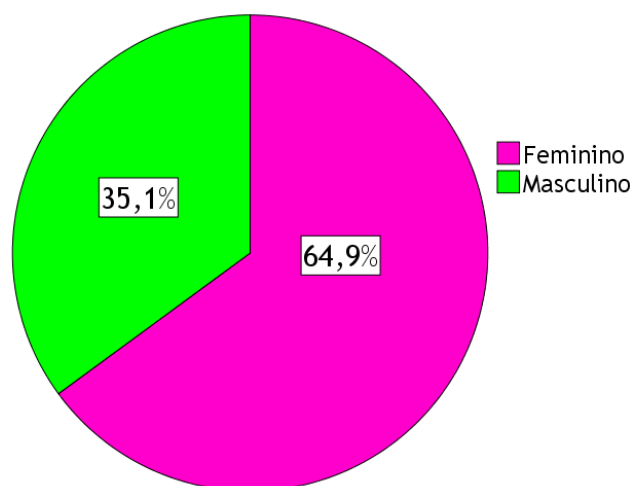


Gráfico 3 – Caracterização do grupo controlo em função do sexo.

Este grupo também foi dividido em indivíduos atópicos e não atópicos (gráfico 4) sem ter em consideração a diferença entre os géneros, uma vez que não está evidenciado que a atopia varie com o género [70]. De entre os indivíduos desta amostra, 30 são atópicos (39%) e 47 são não atópicos (61%). A percentagem de atopia verificada para a população geral é de 39% [71].

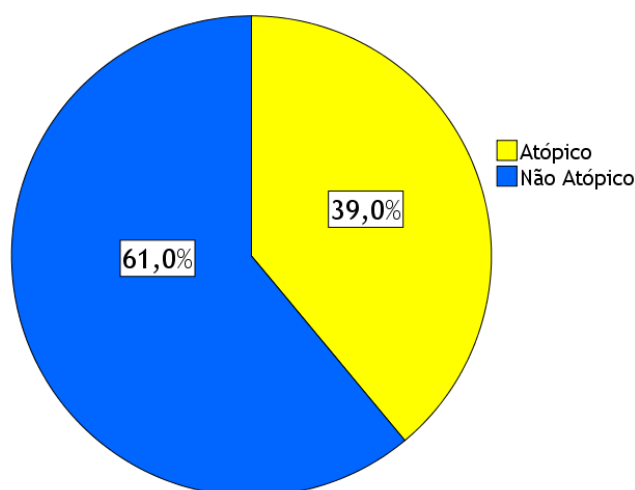


Gráfico 4 - Caracterização do grupo controlo em função da atopia.

1.2 CARACTERIZAÇÃO DO GRUPO TESTE

O grupo teste é constituído 227 doentes com GM, numa faixa etária entre os 41 e os 100 anos e uma média de idades de $76,00 \pm 10,99$ anos. Este grupo inclui 90 indivíduos do sexo feminino, o que corresponde a 60,4% da amostra em estudo e 137 sexo masculino, ou seja, 39,6% (gráfico 5). Para esta amostra, a diferenciação entre género é importante uma vez que a presença de GM é mais frequente em homens do que em mulheres [10], facto também verificado neste estudo.

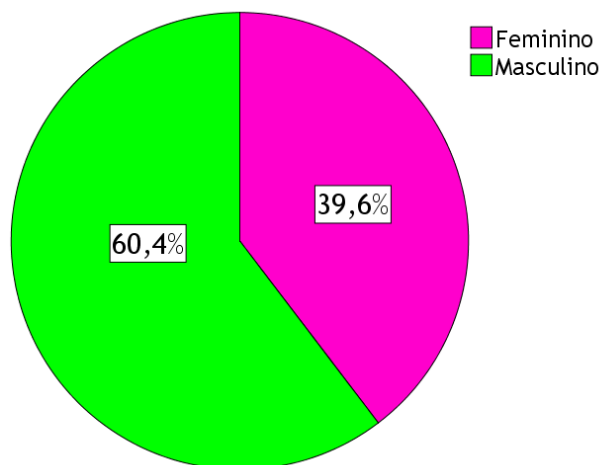


Gráfico 5 - Caracterização do grupo teste em função do sexo.

Tal como o grupo controlo, o grupo teste, foi dividido em 2 sub-grupos: atópicos e não atópicos (gráfico 6). Os indivíduos com GM distribuem-se por 33 indivíduos atópicos (14,5%) e 194 não atópicos (85,5%).

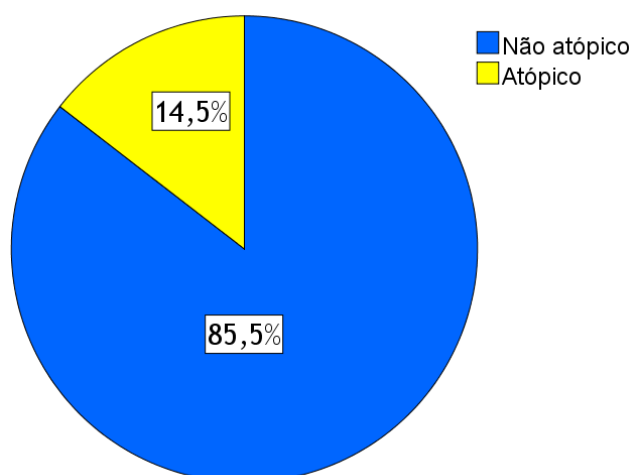


Gráfico 6 - Caracterização do grupo teste em função da atopia.

O grupo teste foi também sub-dividido consoante o tipo de GM encontrada entre os indivíduos do estudo (gráfico 7). Esta classificação foi feita com base nos resultados da imunosubtração. Assim, foi possível identificar 7 tipos de GM que correspondem a 106 indivíduos com GK (46,9%), 45 com GL (19,9%), 29 com MK (12,8%), 5 com ML (2,2%), 18 com AK (8%), 10 com AL (4,4%) e 14 com Cadeias Livres (5,8%) (Gráfico 7).

Através da classificação é possível afirmar que existe maior incidência de cadeias pesadas em relação às leves. A cadeia pesada IgG (66,8%) aparece em maior percentagem no grupo teste, seguida pela IgM (15%), IgA (13,8%) e por fim as cadeias leves (4,4%). Existem

vários tipos de plasmócito e cada um deles produz um tipo de Ig. Nas GM como o MM, um determinado tipo de plasmócito multiplica-se durante um grande número de vezes causando o excesso de produção de um tipo de Ig o que será responsável pelo tipo de GM. Os tipos mais comuns de GM resultam da ligação de uma cadeia pesada com uma cadeia leve, no entanto, quando as cadeias leves não ligam as cadeias pesadas forma-se as GM de cadeia livres. Assim, verifica-se dentro do grupo teste o predomínio da GM do tipo IgG (GK e GL), o que está de acordo com os dados apresentados na literatura [46, 72].

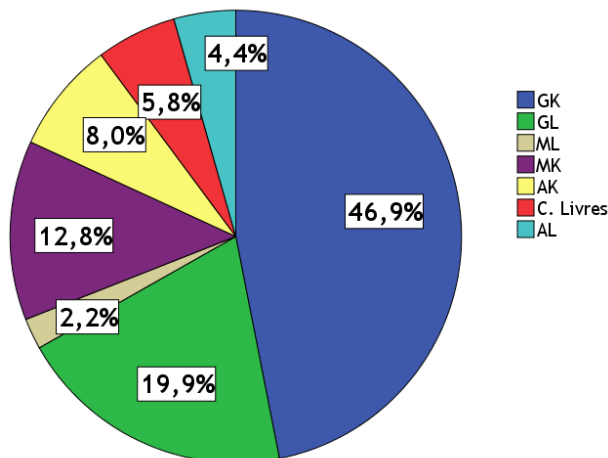


Gráfico 7 - Caracterização do grupo teste segundo o tipo de gamopatas monoclonal. GK: IgG/Kappa, GL: IgG/Lambda, MK: IgM/Kappa, ML: IgM/Lambda, AK: IgA/Kappa, AL: IgA/Lambda e C. livres: kappa e lambda livres.

Após a análise dos proteinogramas e tipificação da componente monoclonal foi possível identificar a existência de quatro padrões diferentes relativos ao tamanho do pico monoclonal. Deste modo, o grupo teste foi também sub-dividido em 4 grupos distintos: três deles apresentam pico afiado (pequeno, médio ou alto) e um grupo apresenta um pico não afiado.

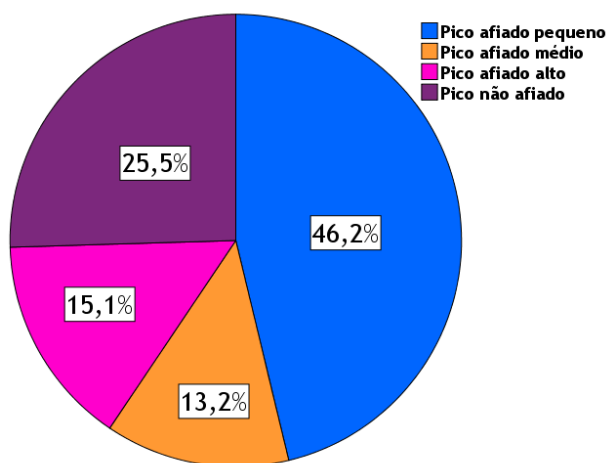


Gráfico 8 - Grupo de indivíduos com gamopatas monoclonais relativamente ao formato do pico monoclonal.

Esta classificação com base na avaliação do pico monoclonal mostrou a presença de cada um dos tipos de picos (gráfico 8), verificando-se que o pico afiado pequeno aparece em maior percentagem (46,2%), seguido do pico não afiado (25,5%), do pico alto (15,1%) e finalmente do pico médio (13,2%).

2. COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE TRIPTASE ENTRE INDIVÍDUOS ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DO GRUPO CONTROLO

A selecção dos grupos de indivíduos atópicos no grupo controlo fez-se por quantificação de IgE específica para distinguir os doentes atópicos dos não atópicos. O gráfico 9 mostra as diferenças nos valores de concentração da triptase, em termos de atopia, dentro do grupo controlo, verificando-se que existe uma concentração média de triptase significativamente superior ($p < 0,0001$) para os indivíduos atópicos ($5,52 \pm 0,39$ ng/mL) que para os não atópicos ($3,37 \pm 0,33$ ng/mL). Os valores médios da concentração de triptase para ambos os grupos são superiores aos valores de referência (< 1 ng/mL). O grupo de indivíduos não atópicos apresenta uma concentração média 3 vezes superior, enquanto para o grupo de atópicos, a concentração média de triptase é 5,5 vezes superior.

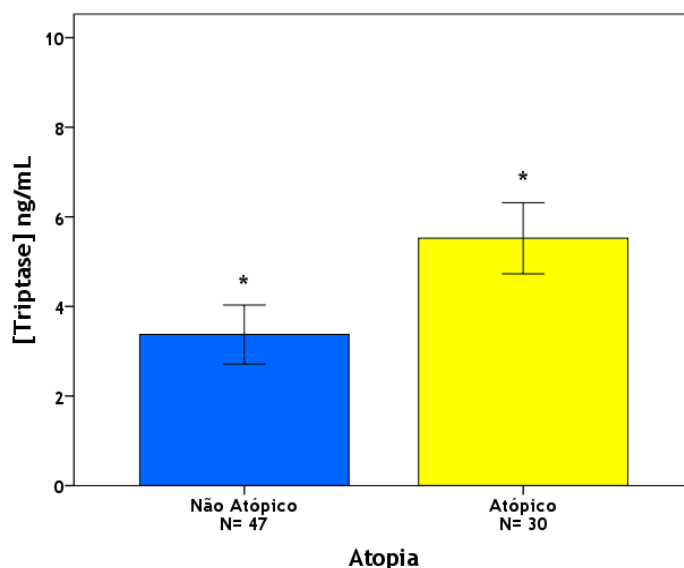


Gráfico 9 - Concentração média de triptase \pm SEM em indivíduos atópicos e não atópicos do grupo controlo. * Nível de significância ($p < 0,0001$).

2.1 COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE TRIPTASE NOS SUBGRUPOS DE INDIVÍDUOS ATÓPICOS DO GRUPO CONTROLO

Os três sub-grupos considerados dentro dos indivíduos atópicos, relativamente aos três níveis de risco estimados a partir da IgE específica para alérgenos inalantes (1 kUA/L

(0,85-1,45); 10 kUA/L (10,0-13,5) e >100kUA/L (100,0-850,0)) foram comparados em relação aos níveis de triptase (Tabela 4). Verificou-se que não existem diferenças significativas entre os três sub-grupos de indivíduos atópicos com diferentes valores de IgE específica. Pela análise dos dados da tabela 4, observa-se que não há uma relação positiva entre o nível de atopia e a concentração de triptase, pois à medida que os níveis de IgE específica aumentam, a concentração de triptase diminui. No entanto, tendo em conta o valor de referência da concentração de triptase (< 1 ng/mL), observa-se que a sua média nos três grupos é elevada.

Tabela 4 - Concentração média de triptase \pm SEM nos grupos de indivíduos de atópicos seleccionados consoante o risco de atopia.

[IgE específica] kUA/L	Risco de Atopia	N	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig.(Bonferroni)
1 (0,85-1,45)	Baixo	11	6,02 \pm 0,83	p > 0,05
10 (10,0-13,5)	Moderado	10	5,77 \pm 0,55	
> 100 (100,0-850,0)	Muito elevado	9	4,64 \pm 0,49	
Total		30	5,52 \pm 0,39	

O grupo de indivíduos atópicos analisado foi também dividido em 4 grupos etários (gráfico 10), sem considerar a diferença entre os géneros, uma vez que não está evidenciado que a atopia varie com o género. Verificou-se que o grupo dos 18-30 anos, foi a faixa etária que apresentou a maior percentagem de indivíduos atópicos (43,3%), observando-se uma diminuição à medida que a idade aumenta. O grupo etário dos 50-60 anos foi o que apresentou a menor percentagem de indivíduos atópicos (10%) dentro do grupo controlo.

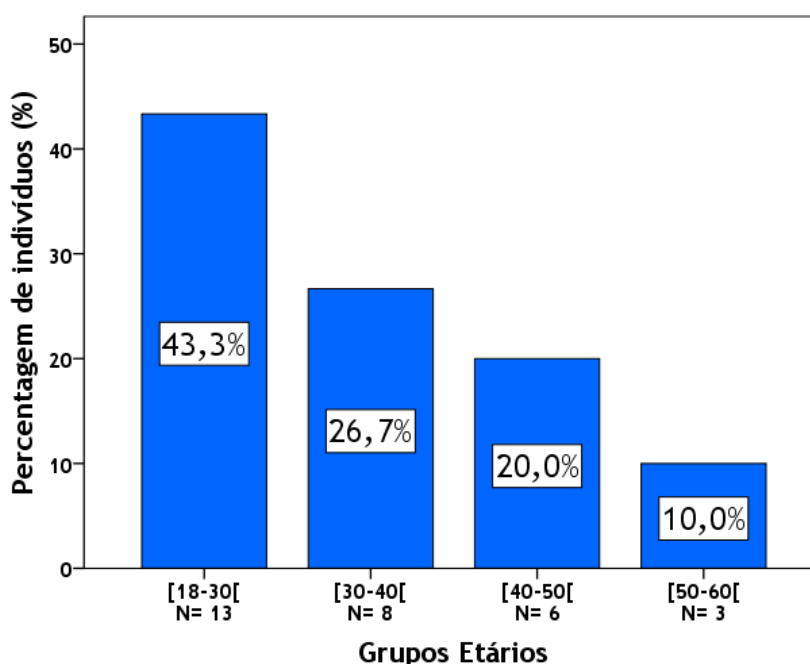


Gráfico 10 - Distribuição dos indivíduos atópicos sem GM em função dos grupos etários estudados.

3. COMPARAÇÃO ENTRE OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE TRIPTASE PARA INDIVÍDUOS ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS DENTRO DO GRUPO TESTE

Contrariamente ao que aconteceu no grupo controlo, o grupo teste, que apresenta GM, exibe uma relação inversa nas concentrações de triptase para os grupos definidos em função da atopia (gráfico 11). Neste grupo, os indivíduos não atópicos com GM mostraram uma concentração média de triptase ($7,27 \pm 0,41$ ng/mL) superior à do grupo de indivíduos atópicos com GM ($5,82 \pm 0,52$ ng/mL). Apesar de as diferenças não serem estatisticamente significativas, ambos os valores são superiores ao valor normal (< 1 ng/mL), sendo que no primeiro caso é sete vezes superior e no segundo é aproximadamente seis vezes superior.

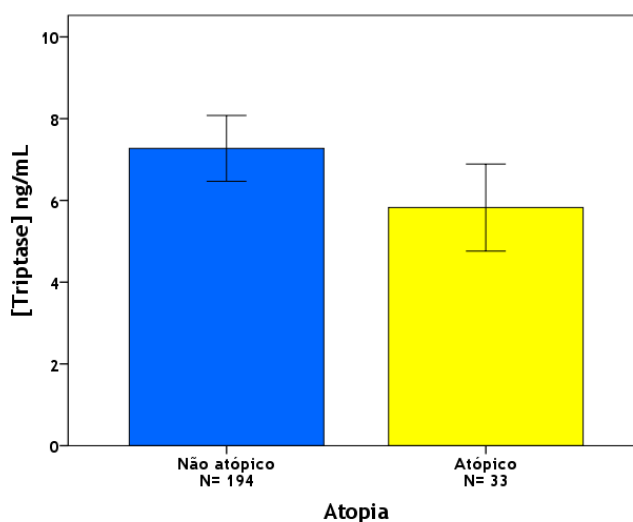


Gráfico 11 - Concentração média de triptase \pm SEM nos grupos de atópicos e não atópicos do grupo teste.

4. COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO TESTE E O GRUPO CONTROLO

De forma a esclarecer se existem alterações nas concentrações de triptase, relativamente aos valores de referência, nos indivíduos que apresentam GM, foi necessário estabelecer comparação entre todos os indivíduos atópicos do grupo teste com o grupo controlo e também fazer a mesma comparação para todos os indivíduos não atópicos com e sem GM.

4.1 COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE TRIPTASE EM INDIVÍDUOS ATÓPICOS COM E SEM GAMOPATIAS MONOCLONAIS

O gráfico 12 representa os valores médios da concentração de triptase nos indivíduos atópicos com e sem GM. Não se observam diferença significativas entre ambos os grupos, apesar de a concentração de triptase variar entre 5 e 6 ng/mL, ou seja, é entre 5 a 6 vezes

superior ao valor normal (< 1ng/mL). O grupo de indivíduos atópicos com GM apresenta uma concentração média de triptase de $5,82 \pm 0,52$ ng/mL, enquanto os indivíduos atópicos sem GM apresentam uma concentração média de triptase de $5,52 \pm 0,39$ ng/mL.

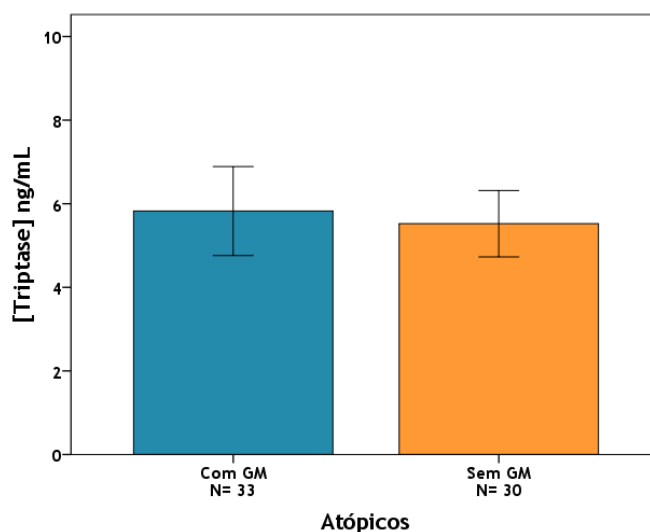


Gráfico 12 - Concentração média de triptase \pm SEM no grupo de atópicos com e sem GM.

4.2 COMPARAÇÃO DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE TRIPTASE EM INDIVÍDUOS NÃO ATÓPICOS COM E SEM GAMOPATIAS MONOCLONAIS

A concentração de triptase média para os indivíduos não atópicos com GM foi de $7,27 \pm 0,40$ ng/mL, enquanto para os indivíduos sem GM foi de $3,37 \pm 0,33$ ng/mL, esta diferença foi considerada significativa ($p < 0,0001$) tal como se pode observar no gráfico 13. Ambos os valores são superiores ao valor normal (< 1 ng/mL), sendo que para o primeiro é 7 vezes superior e para o segundo é 3 vezes superior.

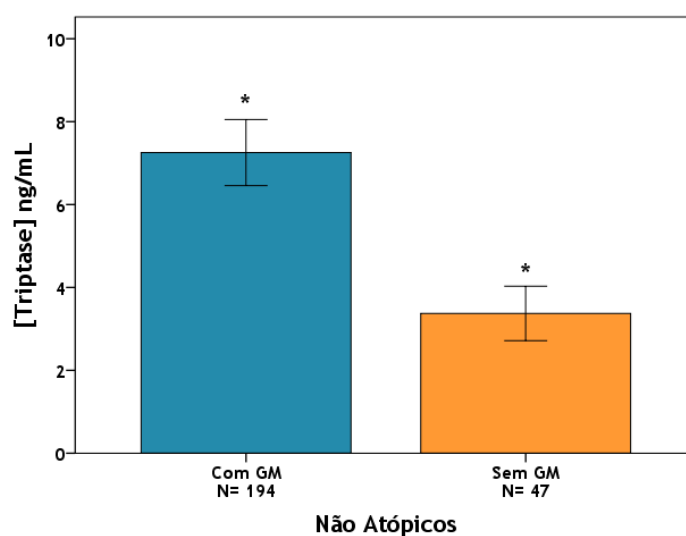


Gráfico 13 - Concentração média de triptase \pm SEM nos grupos de indivíduos não atópicos com e sem GM.

4.3 COMPARAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE IGE ESPECÍFICA PARA AEROALERGÉNIOS COMUNS EM INDIVÍDUOS ATÓPICOS COM E SEM GAMOPATIAS MONOCLONAIS

O gráfico 14 compara as concentrações médias de IgE específica para aeroalergénios entre indivíduos atópicos com e sem GM, observando-se que para estes últimos a concentração de IgE específica é $79,64 \pm 30,59$ kAU/L (nível muito elevado), enquanto nos indivíduos com GM é $3,21 \pm 0,80$ kAU/L (nível moderado), indicando a existência de uma diferença significativa entre ambos os grupos ($p= 0,0001$).

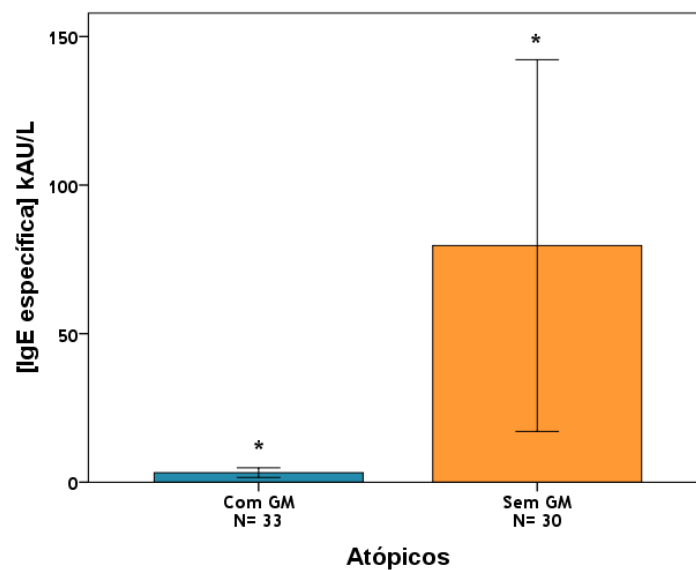


Gráfico 14 - Concentração média de IgE específica \pm SEM para aeroalergénios nos grupos de atópicos com e sem GM.

5. VARIAÇÕES DOS NÍVEIS SÉRICOS DE TRIPTASE EM FUNÇÃO DO TIPO DE GAMOPATIA MONOCLONAL EM INDIVÍDUOS ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS

A análise dos tipos de GM nos indivíduos atópicos e não atópicos é feita com base nas representações gráficas 15 e 16 referentes aos diagramas de extremos e quartis. Isto significa que irão ser representadas mediana em vez das médias. Assim, analisando o grupo de indivíduos não atópicos (gráfico 15) é possível constatar em primeiro lugar que não existem diferenças estatisticamente significativas nos valores de medianas da concentração de triptase (Teste de Bonferroni com $p > 0,05$). Verifica-se também que para a maioria dos casos dentro do grupo considerado, as gamopatias de cadeias kappa apresentam maior número de extremos do que as gamopatias de cadeias lambda, sendo que os intervalos também parecem apresentar uma maior variação.

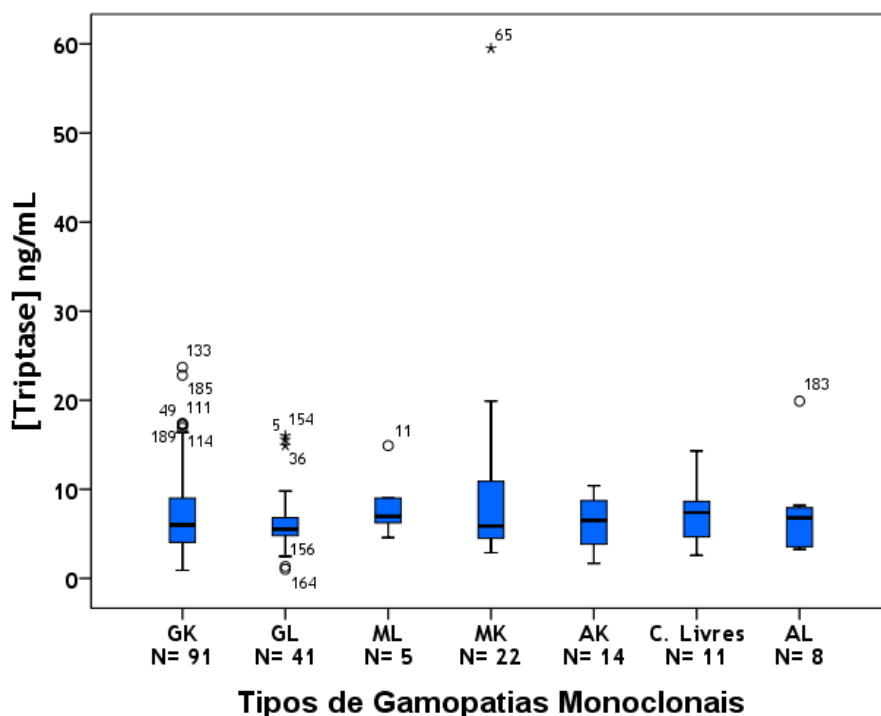


Gráfico 15 - Mediana de triptase em função dos tipos de GM para indivíduos não atópicos. GK: IgG/Kappa, GL: IgG/Lambda, MK: IgM/Kappa, ML: IgM/Lambda, AK: IgA/Kappa, AL: IgA/Lambda e C. livres: kappa e lambda livres. Os números que aparecem junto aos asteriscos e círculos representam os valores extremos, estando numerados pela ordem correspondente à base de dados.

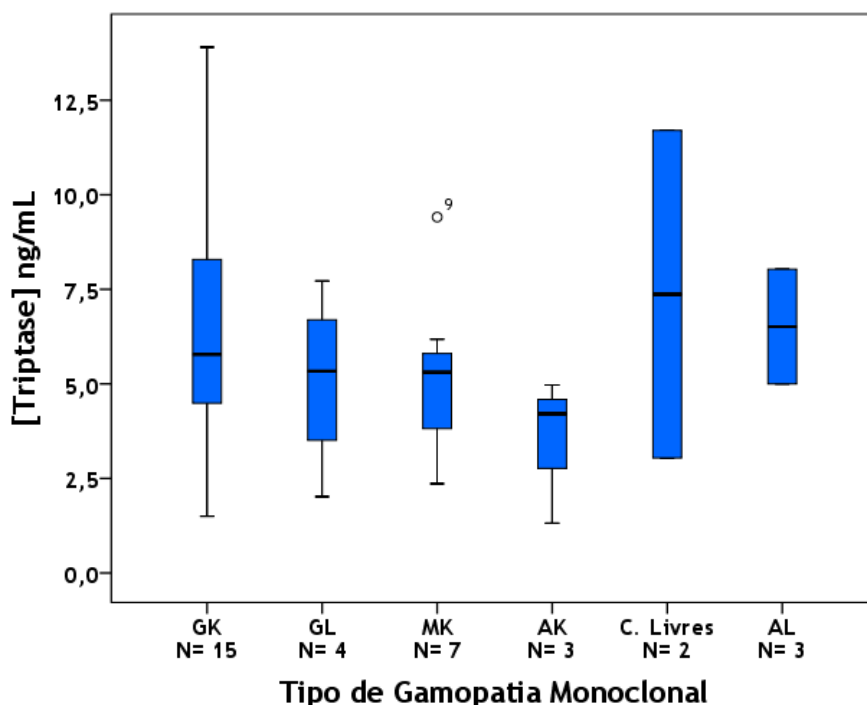


Gráfico 16 - Medianas de triptase em função dos tipos de GM para indivíduos atópicos. GK: IgG/Kappa, GL: IgG/Lambda, MK: IgM/Kappa, AK: IgA/Kappa, AL: IgA/Lambda e C. livres: kappa e lambda livres. O número que aparecem junto ao círculo representam o valor extremo, estando numerado pela ordem correspondente à base de dados.

No gráfico 16 constata-se a não existência de indivíduos atópicos com a GM do tipo ML, sendo também possível observar uma maior mediana para a concentração de triptase nas GM do tipo AL e C. livres em relação aos restantes tipo de GM. No entanto, o teste de Bonferroni ($p > 0,05$) mostra que não existem diferenças entre os vários tipos de GM. Tal como foi verificado para os indivíduos não atópicos (gráfico 16), os indivíduos atópicos apresentam gamopatias de cadeias kappa com mais variações do que as gamopatias de cadeias lambda.

Através da tabela 5 é possível observar que as médias de triptase para cada um dos tipos de GM, entre os indivíduos atópicos e não atópicos, variam entre 3,5-8,28 ng/mL, valores que ultrapassam o valor normal para a concentração de triptase ($< 1\text{ng/mL}$) entre 3-8 vezes. Apesar de não ser possível estabelecer uma comparação entre a concentração de triptase e o tipo de GM entre o grupo de indivíduos não atópicos (ML > MK > AL > GK > C. Livres > GL > AK) e o grupo de indivíduos atópicos (C. Livres > AL > GK > MK > GL > AK) encontram-se algumas semelhanças para estes dois grupos:

AL > GK > GL > AK

MK > GL > AK

C. Livres > GL > AK

Tabela 5 - Concentração média de triptase \pm SEM para cada um dos tipos de GM do grupo teste. Em negrito são evidenciadas as concentrações mínima e máxima de triptase.

[Triptase] \pm SEM ng/mL							
Atopia	GK	GL	MK	ML	AK	AL	C. Livres
Não atópicos	7,16 \pm 0,48	6,28 \pm 0,51	8,28 \pm 1,21	8,34 \pm 1,79	6,08 \pm 0,82	7,47 \pm 1,91	7,13 \pm 0,98
Atópicos	6,48 \pm 0,86	5,10 \pm 1,18	5,19 \pm 0,86	-	3,50 \pm 1,11	6,52 \pm 1,51	7,37 \pm 4,33

Tal como se verificou no ponto 3 (gráfico 11), os indivíduos não atópicos apresentam uma concentração média de triptase superior aos indivíduos atópicos (tabela 5), embora sem significado estatístico. Apenas se verifica uma exceção que corresponde ao tipo de GM de C. livres onde a concentração média de triptase é inferior no grupo de indivíduos não atópicos.

De seguida, avaliou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores de concentração média de triptase para as GM das várias classes: IgG, IgM e IgA em ambos os grupos de indivíduos atópicos e não atópicos (gráfico 17). Apenas foi possível observar diferenças significativas ($p < 0,005$) para os valores de concentração média de triptase nas GM do tipo IgG e IgM dentro do grupo de indivíduos não atópicos. Ainda no mesmo grupo de indivíduos a concentração média de triptase para a GM do tipo IgG é menor do que no tipo IgM. Em contrapartida, no grupo dos indivíduos atópicos esta relação parece invertida. Verificou-se ainda que em ambos os grupos de atópicos e não atópicos, a concentração de triptase para a imunoglobulina IgG é superior do que para a IgA.

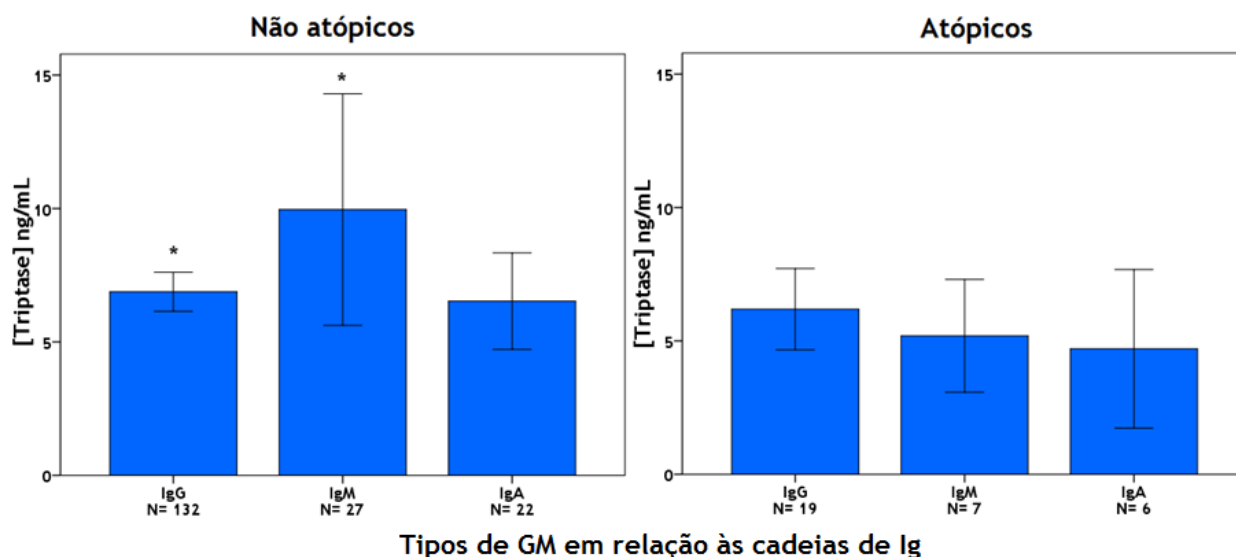


Gráfico 17 - Concentração média de triptase \pm SEM em função dos tipos de GM em relação às cadeias de imunoglobulinas para indivíduos atópicos e não atópicos.

Na tabela 6, os grupos estudados apresentaram, na sua maioria os valores inferiores de concentração média de triptase para as GM do tipo IgA em relação às IgG e IgM, tanto para o grupo de indivíduos atópicos como para os não atópicos.

Tabela 6 - Concentração média de triptase \pm SEM para cada um dos tipos de GM de cadeia pesada do grupo teste.

Atopia	[Triptase] \pm SEM ng/mL		
	IgG	IgM	IgA
Não atópicos	6,89 \pm 0,37	8,29 \pm 1,01	6,61 \pm 0,87
Atópicos	6,19 \pm 0,72	5,19 \pm 0,86	4,71 \pm 1,07

Por fim, testou-se a existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores de concentração média de triptase para as GM segundo o tipo de cadeia leve e a presença de proteína de Bence-Jones: kappa, lambda e cadeias livres para ambos os grupos de indivíduos atópicos e não atópicos (gráfico 18 e tabela 7). Observa-se que, apesar de não existirem diferenças significativas na concentração de triptase entre os três grupos de GM de cadeia leve, as concentrações médias de triptase para as gamopatias de cadeias leves kappa são superiores às concentrações de triptase para as gamopatias de cadeias leves gamma para ambos os grupos de atópicos e não atópicos. Resultados são concordantes com os descritos na literatura, pois mais de metade das cadeias leves são do tipo kappa (67,7%) tal como foi observado no estudo de Kyle *et al* [46].

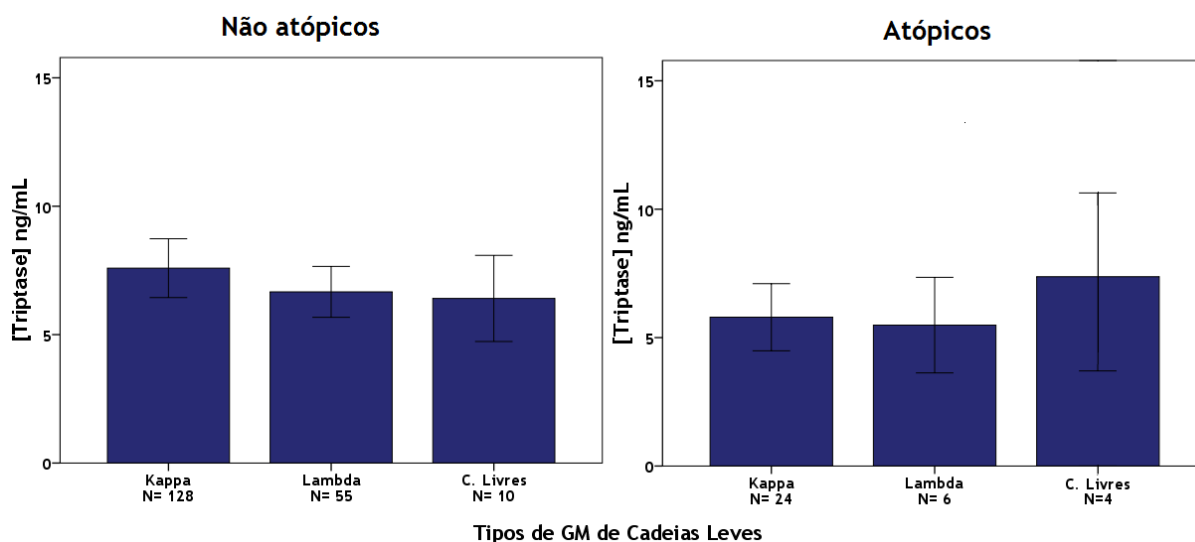


Gráfico 18 - Concentração média de triptase \pm SEM em função dos tipos de GM de cadeias leves para indivíduos atópicos e não atópicos.

Uma diferença perceptível nos valores de concentração de triptase entre os grupos de atópicos e não atópicos é que o grupo de C. Livres nos indivíduos atópicos apresenta concentração superior relativamente aos outros dois grupos (kappa e lambda), embora não seja estatisticamente significativo. Por outro lado, a concentração média de triptase para os indivíduos não atópicos no grupo de cadeias livres é a menor dos três grupos comparados.

Tabela 7 - Concentrações médias de triptase \pm SEM para cada um dos tipos de GM de cadeias leves do grupo teste.

[Triptase] \pm SEM ng/mL			
Atopia	Kappa	Lambda	C. Livres
Não atópicos	7,51 \pm 0,54	6,79 \pm 0,49	7,13 \pm 0,98
Atópicos	5,77 \pm 0,63	5,49 \pm 0,76	7,37 \pm 4,33

6. CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE TRIPTASE E A CONCENTRAÇÃO DE CADEIAS PESADAS DAS IMUNOGLOBULINAS NOS INDIVÍDUOS ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS COM GAMOPATIAS MONOCLONAIS

Através da análise das tabelas 8 e 9 pode afirmar-se que as concentrações de Ig de cadeias pesadas são independentes das concentrações de triptase para ambos os grupos de indivíduos atópicos e não atópicos com GM, uma vez que as significâncias obtidas pela aplicação da correlação de Spearman são superiores a 0,05.

Tabela 8 - Concentração média de imunoglobinas \pm SEM com os respectivos valores de referência e valores da concentração média de triptase \pm SEM para indivíduos não atópicos.

Tipo de Ig	Valores de referência mg/dL	[Ig] \pm SEM mg/dL	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig.(Spearman)
IgG	40 - 274	1873,06 \pm 122,85	6,89 \pm 0,37	0,248
IgM	751 - 1560	1446,83 \pm 342,76	8,29 \pm 1,01	0,286
IgA	82 - 453	1940,91 \pm 453,44	6,61 \pm 0,87	0,780

Tabela 9 -Concentrações médias de imunoglobinas \pm SEM com os respectivos valores de referência e valores da concentração média de triptase \pm SEM para os indivíduos atópicos.

Tipo de Ig	Valores de referência mg/dL	[Ig] \pm SEM mg/dL	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig.(Spearman)
IgG	40 - 274	1485,16 \pm 137,62	6,19 \pm 0,72	0,772
IgM	751 - 1560	610,14 \pm 185,86	5,19 \pm 0,86	0,383
IgA	82 - 453	1622,40 \pm 559,71	4,71 \pm 1,07	0,188

7. CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE TRIPTASE E A RAZÃO KAPPA/LAMBDA LIVRES NOS INDIVÍDUOS ATÓPICOS E NÃO ATÓPICOS COM GAMOPATIAS MONOCLONAIS

O excesso de cadeias leves (kappa e lambda) entra na corrente sanguínea como cadeias livres. Na prática clínica, a razão kappa/lambda livres é importante para o diagnóstico precoce e monitorização da progressão do mieloma múltiplo uma vez que é indicativo da desorganização clonal [73]. Assim, quando esta razão se encontra acima ou abaixo dos valores normais é indicativo da existência de monoclonalidade. Por esta razão, fomos verificar a existência de correlação entre a razão kappa/lambda livres com a concentração de triptase.

Neste estudo, verificou-se se haveria correlação (teste de Spearman) entre os valores de concentração da triptase e a razão kappa livre/lambda livre (R:KL/LL) para os grupos de indivíduos atópicos e não atópicos com GM. Para este efeito, os indivíduos em estudo foram classificados em dois sub-grupos (normal ou patológico) relativamente aos valores de R:KL/LL. Observou-se que para os indivíduos não atópicos (tabela 10), em ambos os sub-grupos, normal e patológico, não se verificou correlação. Pela análise dos dados obtidos, e tendo em conta os valores de referência, observa-se que a média para a concentração de triptase nos indivíduos com R:KL/LL normal e patológica, é entre 7 a 8 vezes superior relativamente ao valor de normal (<1ng/mL).

Tabela 10 - Razão kappa/lambda livres com respectivos valores de referência e valores da concentração média de triptase \pm SEM para o grupo de indivíduos não atópicos.

R:KL/LL	N	Valor de referência	[R:KL/LL] \pm SEM	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig. (Spearman)
Normal	114	0,26 - 1,65	0,87 \pm 0,03	7,52 \pm 0,61	0,394
Patológico	79	<0,26 e>1,65	17,61 \pm 8,63	6,93 \pm 0,46	0,637

Tabela 11 - Razão kappa/lambda livres \pm SEM com respectivos valores de referência e valores da concentração média de triptase \pm SEM para o grupo de indivíduos atópicos.

R:KL/LL	N	Valor de referência	[R:KL/LL] \pm SEM	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig. (Spearman)
Normal	27	0,26 - 1,65	0,72 \pm 0,07	5,81 \pm 0,53	0,697
Patológico	5	<0,26 e>1,65	3,55 \pm 0,69	6,16 \pm 2,09	0,188

Na tabela 11, não se verificou correlação nos indivíduos atópicos entre a concentração de triptase e os valores da R:KL/LL em ambos os grupos normal e patológico ($p= 0,869$ e $p= 0,544$), uma vez que os valores de significância obtidos para o teste de correlação de Spearman são superiores a 0,05 para ambos os casos.

8. CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DE TRIPTASE E DA COMPONENTE MONOCLONAL EM INDIVÍDUOS COM GAMOPATIAS MONOCLONAIS

Num primeiro passo, consideraram-se quatro grupos, três para formatos de pico afiados: pequeno, médio e alto e um para um formato de pico largo (Figuras 11 e 12). No segundo passo, os três tipos de pico afiados foram agrupados apenas num, o qual foi comparado com o pico não afiado. Nas tabelas 12 e 13, à medida que o pico cresce, a componente monoclonal (CM) acompanha esse crescimento, no entanto o mesmo não se verifica para as concentrações de triptase. No grupo de indivíduos atópicos, o tipo de pico com menor concentração média de triptase foi o pico afiado pequeno, sendo que para o pico afiado alto no qual não foi possível a apresentação dos dados por ser constituído apenas por um indivíduo.

Não foi possível estabelecer correlação entre a concentração de triptase e as CM na maioria dos casos analisados (correlação de Spearman) para o grupo de indivíduos atópicos e não atópicos, que consideram os quatro formatos de picos, uma vez que como se pode observar a partir dos dados das tabelas 12 e 13 não existe um padrão comum entre os dois parâmetros analisados, situação que é confirmado pelos valores de significâncias ($p > 0,05$).

Na tabela 13, apenas existiu correlação entre as CM e as concentrações de triptase no grupo que apresentava pico afiado médio ($p < 0,01$).

Tabela 12 - Concentrações média de triptase \pm SEM e valores da concentração média de CM \pm SEM para cada um dos grupos relativos ao formato do pico do proteinograma três afiados (pequeno, médio, alto e um não afiado) para os indivíduos não atópicos.

Formato do pico	N	[CM] \pm SEM g/dL	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig.(Spearman)
Afiado pequeno	86	0,30 \pm 0,02	7,62 \pm 0,77	0,315
Afiado médio	25	1,02 \pm 0,07	7,00 \pm 0,63	0,629
Afiado alto	31	3,26 \pm 0,34	7,63 \pm 0,94	0,694
Não afiado	42	0,06 \pm 0,004	6,43 \pm 0,57	0,191

Tabela 13 - Concentração média de triptase \pm SEM e valores da concentração média de CM \pm SEM para cada um dos grupos relativos ao formato do pico do proteinograma três afiados (pequeno, médio, alto) e um não afiado para os indivíduos atópicos. * O grupo com pico afiado alto apenas possui um indivíduo, pelo que não é possível estabelecer uma correlação nem estimar o SEM. A [CM]= 2,09 e [triptase]= 1,32 ng/mL.

Formato do pico	N	[CM] \pm SEM g/dL	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig.(Spearman)
Afiado pequeno	12	0,36 \pm 0,07	5,73 \pm 0,53	0,354
Afiado médio	3	0,65 \pm 0,03	8,87 \pm 2,63	<0,01
Afiado alto	1	*	*	*
Não afiado	12	0,05 \pm 0,008	5,11 \pm 0,70	0,527

Nas tabelas 13 e 14, observa-se que os picos afiados apresentam maior CM em ambos os grupos de indivíduos atópicos e não atópicos, no entanto, as concentrações de triptase apresentam uma variação inversa nestes dois grupos. Aparecem superiores nos picos afiados relativamente aos picos largos no grupo de indivíduos não atópicos, mas apresentam valores superiores nos picos não afiados relativamente aos picos afiados para o grupo de indivíduos atópicos.

Tabela 14 - Concentração média de triptase \pm SEM e valores da concentração média de CM \pm SEM para os grupos com pico afiado e pico não afiado para os indivíduos não atópicos.

Formato do pico	N	[CM] \pm SEM g/dL	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig.(Spearman)
Afiado	142	1,07 \pm 0,12	7,51 \pm 0,52	0,602
Não afiado	42	0,06 \pm 0,004	6,43 \pm 0,57	0,191

Neste caso, também não foi possível estabelecer correlação entre a concentração de triptase e as CM (correlação de Spearman) para o grupo de indivíduos atópicos e não atópicos, que consideram os dois formatos de picos: afiado e não afiado, uma vez que como se pode observar a partir dos dados das tabelas 12 e 13 não existe um padrão comum entre os dois parâmetros analisados, facto confirmado pelos valores de significâncias ($p > 0,05$).

Tabela 15 - Concentração média de triptase \pm SEM e valores da concentração média de CM \pm SEM para os grupos com pico afiado e pico não afiado para os indivíduos atópicos.

Formato do pico	N	[CM] \pm SEM g/dL	[Triptase] \pm SEM ng/mL	Sig.(Spearman)
Afiado	16	0,52 \pm 0,12	6,04 \pm 0,72	0,395
Não afiado	12	0,05 \pm 0,008	5,11 \pm 0,70	0,527

Introdução
Materiais e Métodos
Resultados
Discussão e Conclusões
Perspectivas Futuras
Referências Bibliográficas

O presente estudo teve como objectivo principal avaliar as variações da concentração de triptase em indivíduos com GM com o intuito de utilizar esta proteína como marcador de prognóstico deste tipo de patologias. A atopia foi tida em conta como parâmetro de diferenciação, uma vez que está descrito que na sua presença os níveis séricos de triptase se encontram em geral aumentados [74]. No entanto, tendo em conta os subgrupos de indivíduos atópicos considerados no grupo controlo, verificou-se uma relação inversa entre a atopia e a concentração de triptase. Este facto pode ser devido à escolha aleatória dos indivíduos de entre os doentes da consulta de alergologia, cuja história clínica em termos de anafilaxia e terapia imunossensibilizante não era conhecida. É de considerar também o pequeno número de indivíduos presentes neste grupo, uma vez que para pequenas populações os factores de natureza aleatória são particularmente importantes.

Ainda relativamente aos indivíduos atópicos do grupo controlo, verificou-se a diminuição da atopia com o aumento da idade, facto que está de acordo com a literatura, a qual refere que a prevalência da atopia diminui com a idade, visto que o sistema imunitário tende a torna-se menos reactivo nos indivíduos mais velhos [18].

Nos indivíduos atópicos e não atópicos do grupo controlo, observou-se uma clara influência da atopia nos níveis séricos de triptase, tal como referenciado na literatura [74]. Por outro lado, no grupo teste não existem diferenças em relação à concentração de triptase. Assim, e apesar de não existirem estudos que caracterizem o efeito dos clones tumorais sobre os restantes clones de plasmócitos os MC, pressupõe-se a existência de um efeito inibitório dos clones tumorais sobre os linfócitos produtos de IgE específica.

Para o grupo de indivíduos atópicos não se verificaram diferenças significativas nos níveis séricos de triptase entre os indivíduos com e sem GM, embora em ambas as situações se registasse um aumento destes níveis relativamente ao valor de referência. De modo a explicar este resultado é importante relembrar que a triptase é um marcador de alterações mastocitárias [54] e, como tal, encontra-se aumentada em muitas situações dependentes da angiogénese, por exemplo, durante o desenvolvimento tumoral [14], mas também nas reacções alérgicas como a anafilaxia [22]. Ainda dentro do grupo de indivíduos atópicos foi quantificada a concentração de IgE para alérgénios inalantes nos indivíduos com e sem GM, observando-se que quer para níveis séricos muito elevados de IgE específica presentes nos indivíduos sem GM, quer para níveis muito baixos nos indivíduos com GM, as concentrações médias de triptase em ambos os grupos são muito semelhantes, o que sugere a primeira evidência no estudo da triptase como marcador independente da atopia.

No grupo de indivíduos não atópicos com e sem GM observaram-se diferenças estatisticamente significativas relativamente aos níveis séricos de triptase. A concentração média de triptase para o grupo de indivíduos com GM foi superior, o que pode ser explicado a partir de dados da literatura. Estudos sugerem o envolvimento dos MC no desenvolvimento

tumoral devido a libertação de factores como a histamina, heparina, triptase e factores de crescimento que conduzem à migração e proliferação das células do endotélio promovendo a neoangiogénese [27, 30].

Não foi possível estabelecer uma relação entre a concentração de triptase e o tipo de GM uma vez que não existem diferenças significativas nos grupos de indivíduos atópicos e não atópicos, facto que reforça a ideia da triptase ser um marcador independente nestes dois grupos. A partir dos dados obtidos para os tipos de GM em relação às cadeias de Ig, observa-se que as GM do tipo IgM (MK e ML) são muito mais agressivas e constituem pior prognóstico do que as GM do tipo IgG (GK e GL) ou IgA (AK e AL), uma vez que as concentrações de triptase são superiores o que indica uma maior desgranulação e consequentemente maior neovascularização. Assim, o facto de ser não atópico e desenvolver GM do tipo IgM poderá indicar um pior prognóstico da doença.

Verificou-se uma predominância das GM do tipo kappa em relação às do tipo lambda, o que está de acordo com os dados da literatura [46] e também um valor de concentração de triptase superior para as cadeias kappa. É de referir ainda que a produção de cadeias kappa é duas vezes superior à produção de cadeias lambda [75]. Isto ocorre porque a excreção de cadeias kappa (geralmente na forma monomérica) é muito mais rápida do que para as cadeias lambda (que se encontra usualmente na forma de dímero) [76].

Como é sabido, as Ig produzidas são directamente proporcionais à quantidade de clones de plasmócitos, não tendo sido observada correlação com a concentração de triptase e a concentração das Ig nos diferentes tipos de GM. Este resultado reforça mais uma vez a ideia de que a triptase é um marcador independente da atopia, o que é facilmente percebido, uma vez que as Ig são produzidas nos plasmócitos, enquanto a proteína triptase resulta da desgranulação mastocitária. O facto de as concentrações de triptase no grupo de indivíduos não atópicos com GM ser sempre superior relativamente aos indivíduos sem GM, aumenta as suspeitas de que a concentração de triptase possa estar a ser activada por outros mecanismos.

A análise estatística não mostrou relação entre a razão kappa/lambda livres (indicador de monoclonalidade [76]) e a concentração de triptase (indicador de activação mastocitária [74]) em ambos os grupos de indivíduos atópicos e não atópicos, tendo-se verificado que o número de indivíduos com valores normais da razão kappa/lambda livres era maior. Assim, estes dados sugerem a existência de outros mecanismos de desgranulação de MC independentes da IgE a ser activados.

Os mastócitos também podem ser activados através de espécies reactivas de oxigénio (ROS), nomeadamente o anião superóxido. As ROS são produzidas no metabolismo normal do organismo, no entanto em determinadas situações patológicas podem estar aumentadas. O

MM é uma neoplasia sanguínea incurável que ocorre na medula óssea, caracterizada pela expansão clonal de plasmócitos, e é acompanhada pela produção persistente de um único tipo de imunoglobulina. Esta produção sobrecarrega a maquinaria de processamento do retículo endoplasmático, gerando a acumulação de proteínas monoclonais o que aumenta as ROS [77, 78]. Assim, as ROS poderão ser a causa responsável pela activação mastocitária nos indivíduos do estudo.

No estudo realizado, não foi encontrada correlação entre os vários formatos de pico com a concentração de triptase e conseqüentemente mostrou-se que não existia relação entre a CM e a concentração de triptase.

Este estudo permitiu determinar pela primeira vez a relação entre os níveis séricos de triptase em indivíduos com GM numa população alargada de indivíduos adultos do distrito da Guarda. Assim, é possível concluir através a análise dos dados que apesar de a triptase contida nos grânulos dos MC ser responsável pela angiogénese das GM, esta não parece constituir um marcador diferencial no prognóstico das GM nos indivíduos atópicos.

Introdução
Materiais e Métodos
Resultados
Discussão e Conclusões
Perspectivas Futuras
Referências Bibliográficas

Para completar o estudo seria da maior utilidade conhecer a história clínica dos doentes, de modo a poder utilizar alguns critérios de exclusão durante a escolha dos indivíduos, nomeadamente, doentes em tratamento de Mieloma Múltiplo ou doentes medicados com imunomoduladores, citostáticos ou anti-histamínicos de modo a eliminar condições conhecidas que interferem com as concentrações séricas de IgE específica para alergénios inalantes comuns e de triptase.

Tendo em conta que a incidência das GM aumenta com a idade, conforme se encontra descrito na literatura, e, actualmente se observa um envelhecimento da população seria também interessante realizar um estudo da variação dos níveis de triptase com a progressão da doença.

Por último, a quantificação da IgE total permitiria eliminar possíveis interferências causadas pela elevação da concentração de IgE total nos valores de concentração de triptase nos indivíduos da população.

Introdução
Materiais e Métodos
Resultados
Discussão e Conclusões
Perspectivas Futuras
Referências Bibliográficas

1. Arosa, F.A. and E.M. Cardoso, *Fundamentos da Imunologia*. 1st ed. 2007: Lidel.
2. Roitt, I., J. Brostoff, and D. Male, *Immunology*. 7th ed. 2006: Mosby.
3. Rabb, H., *The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney*. *Kidney Int*, 2002. **61**(6): p. 1935-46.
4. Gaw, A., R.A. Cowan, D. O'reilly, J.M. Stewart, and J. Shepherd, *Bioquímica Clínica*. 2nd ed. 2001: Guanabara Koogan.
5. Fauci, A.S., E. Braunwald, D.L. Kasper, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson, and J. Loscalzo, *Harrison's Principle of Internal Medicine*. 17th ed. 2008: Mc Graw Hill Medical.
6. Bast, B.J., S.E. Boom, and R.E. Ballieux, *Characterization of the colony-forming cell in monoclonal gammopathies*. *Blood*, 1982. **60**(3): p. 608-12.
7. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Monoclonal gammopathies of undetermined significance: a review*. *Immunol Rev*, 2003. **194**: p. 112-39.
8. Ludwig, H., J. Meran, and N. Zojer, *Multiple myeloma: an update on biology and treatment*. *Annals of Oncology*, 1999. **10 Suppl 6**: p. 31-43.
9. Burmester, G.-R., A. Pezzuto, and S.O.N. Wandrey, *Color Atlas of Immunology*. 1st ed. 2003: Thieme.
10. Faria, R.M.D. and R.O.P.e. Silva, *Monoclonal gammopathies - diagnosis criteria and differential diagnosis*. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 2007. **29**(1): p. 17-22.
11. Paul, W., *Fundamental Immunology*. 2003: Lippincott Williams & Wilkins
12. San-Miguel, J. and F. Sánchez-Guijo, *Cuestiones en Hematologia*. 2nd ed. 2002: Harcourt.
13. Krishnaswamy, G., J. Kelley, D. Johnson, G. Youngberg, W. Stone, S.K. Huang, J. Bieber, and D.S. Chi, *The human mast cell: functions in physiology and disease*. *Front Biosci*, 2001. **6**: p. D1109-27.
14. Hiromatsu, Y. and S. Toda, *Mast cells and angiogenesis*. *Microsc Res Tech*, 2003. **60**(1): p. 64-9.
15. Galli, S.J., S. Nakae, and M. Tsai, *Mast cells in the development of adaptive immune responses*. *Nature Immunol*, 2005. **6**(2): p. 135-42.
16. Mekori, Y.A. and D.D. Metcalfe, *Mast cells in innate immunity*. *Immunol Rev*, 2000. **173**: p. 131-40.
17. de Mora, F., A. Puigdemont, and R. Torres, *The role of mast cells in atopy: what can we learn from canine models? A thorough review of the biology of mast cells in canine and human systems*. *Br J Dermatol*, 2006. **155**(6): p. 1109-23.
18. Mediaty, A. and K. Neuber, *Total and specific serum IgE decreases with age in patients with allergic rhinitis, asthma and insect allergy but not in patients with atopic dermatitis*. *Immun Ageing*, 2005. **2**(1): p. 9.

19. Acero, S., A.I. Tabar, B.E. García, S. Echechipía, and J.M. Olaguibel, *Anaphylaxis: Etiological Diagnosis*. Sociedade Espanhola de Alergologia e Imunologia Clínica 1999. **14**(3): p. 133-137.
20. Maltby, S., K. Khazaie, and K.M. McNagny, *Mast cells in tumor growth: angiogenesis, tissue remodelling and immune-modulation*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1796**(1): p. 19-26.
21. Criado, P.R., R.F.J. Criado, C. Vasconcellos, R.d.O. Ramos, and A.C. Gonçalves, *Severe cutaneous adverse reactions to drugs - relevant aspects to diagnosis and treatment - Part I: anaphylaxis and anaphylactoid reactions, erythroderma and the clinical spectrum of Stevens-Johnson syndrome & toxic epidermal necrolysis (Lyell's disease)*. Anais Brasileiros De Dermatologia, 2004. **79**(4): p. 471-488.
22. Simons, F.E.R., A.J. Frew, I.J. Ansotegui, B.S. Bochner, D.B.K. Golden, F.D. Finkelman, D.Y.M. Leung, J. Lotvall, G. Marone, D.D. Metcalfe, U. Muller, L.J. Rosenwasser, H.A. Sampson, L.B. Schwartz, M. van Hage, and A.F. Walls, *Risk assessment in anaphylaxis: Current and future approaches*. J Allergy Clin Immunol, 2007. **120**(1): p. S2-S24.
23. Zhang, W., G. Stoica, S.I. Tasca, K.A. Kelly, and C.J. Meininger, *Modulation of tumor angiogenesis by stem cell factor*. Cancer Res, 2000. **60**(23): p. 6757-62.
24. Benitez-Bribiesca, L., A. Wong, D. Utrera, and E. Castellanos, *The role of mast cell tryptase in neoangiogenesis of premalignant and malignant lesions of the uterine cervix*. J Histochem Cytochem, 2001. **49**(8): p. 1061-2.
25. Takanami, I., K. Takeuchi, and M. Naruke, *Mast cell density is associated with angiogenesis and poor prognosis in pulmonary adenocarcinoma*. Cancer, 2000. **88**(12): p. 2686-92.
26. Ribatti, D., A. Vacca, A. Marzullo, B. Nico, R. Ria, L. Roncali, and F. Dammacco, *Angiogenesis and mast cell density with tryptase activity increase simultaneously with pathological progression in B-cell non-Hodgkin's lymphomas*. Int J Cancer, 2000. **85**(2): p. 171-5.
27. Crivellato, E., B. Nico, and D. Ribatti, *Mast cells and tumour angiogenesis: new insight from experimental carcinogenesis*. Cancer Lett, 2008. **269**(1): p. 1-6.
28. Almholt, K. and M. Johnsen, *Stromal cell involvement in cancer*. Recent Results Cancer Res, 2003. **162**: p. 31-42.
29. Bagley, R.G., *The Tumor Microenvironment (Cancer Drug Discovery and Development)*. 1st ed. 2010: Human Press.
30. Ribatti, D., E. Crivellato, and S. Molica, *Mast cells and angiogenesis in haematological malignancies*. Leuk Res, 2009. **33**(7): p. 876-9.
31. Pimenta, A., *Mieloma Multiplo: Diagnóstico e manejo inicial*. Hematologia, 2007. **52**: p. 137-141.

32. Kyle, R.A., T.M. Therneau, S.V. Rajkumar, E.D. Remstein, J.R. Offord, D.R. Larson, M.F. Plevak, and L.J. Melton, 3rd, *Long-term follow-up of IgM monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *Blood*, 2003. **102**(10): p. 3759-64.
33. Bottini, P., *Testes Laboratoriais para a avaliação do componente monoclonal*. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2007. **29**(1): p. 23-26.
34. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Epidemiology of the plasma-cell disorders*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007. **20**(4): p. 637-64.
35. Kyle, R.A., T.M. Therneau, S.V. Rajkumar, J.R. Offord, D.R. Larson, M.F. Plevak, and L.J. Melton, 3rd, *A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(8): p. 564-9.
36. Brick, W., G.B. Faguet, and R. Burgess (2009) *Heavy Chain Disease, Gamma*.
37. Dispenzieri, A. and R.A. Kyle, *Multiple myeloma: clinical features and indications for therapy*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005. **18**(4): p. 553-68.
38. McKay, K., L. Striker, and G.d.A. . *Dysproteinemias and paraproteinemias*. . *Renal pathology with Clinical and Functional Correlations*, 1989: p. 1363-1416.
39. Wahner-Roedler, D.L. and R.A. Kyle, *Heavy chain diseases*. *Clinical Hematology*, 2005. **18**(4): p. 729-746.
40. Kyle, R.A. and S.V. Rajkumar, *Monoclonal gammopathies of undetermined significance*. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2005. **18**(4): p. 689-707.
41. Durie, B.G., R.A. Kyle, A. Belch, W. Bensinger, J. Blade, M. Boccadoro, J.A. Child, R. Comenzo, B. Djulbegovic, D. Fantl, G. Gahrton, J.L. Harousseau, V. Hungria, D. Joshua, H. Ludwig, J. Mehta, A.R. Morales, G. Morgan, A. Nouel, M. Oken, R. Powles, D. Roodman, J. San Miguel, K. Shimizu, S. Singhal, B. Sirohi, P. Sonneveld, G. Tricot, and B. Van Ness, *Myeloma management guidelines: a consensus report from the Scientific Advisors of the International Myeloma Foundation*. *Hematol J*, 2003. **4**(6): p. 379-98.
42. Silva, W.D., I.L.B. Mota, and O.G. Bier, *Imunologia Básica e Aplicada*. 5th ed. 2003: Guanabara Koogan.
43. Pandit, S.R., *Multiple myeloma: treatment options for an incurable disease*. *J Assoc Physicians India*, 2005. **53**: p. 1060-4.
44. Mcphee, S.J. and M.A. Papadakis, *Current Medical Diagnosis and Treatment*. 18th ed. 2006: McGraw-Hill: LANGE
45. Gay-Bellile, C., D. Bengoufa, P. Houze, D. Le Carrer, M. Benlakehal, B. Bousquet, B. Gourmel, and T. Le Bricon, *Automated multicapillary electrophoresis for analysis of human serum proteins*. *Clin Chem*, 2003. **49**(11): p. 1909-15.
46. Kyle, R.A., T.M. Therneau, S.V. Rajkumar, D.R. Larson, M.F. Plevak, J.R. Offord, A. Dispenzieri, J.A. Katzmann, and L.J. Melton, 3rd, *Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(13): p. 1362-9.

47. Aguzzi, F. and N. Poggi, *"Immunosubtraction" electrophoresis: a simple method for identifying specific proteins producing the cellulose acetate electrophoretogram*. Boll Ist Sieroter Milan, 1977. **56**(3): p. 212-6.
48. Zhang, H., V. Vakil, M. Braunstein, E.L. Smith, J. Maroney, L. Chen, K. Dai, J.R. Berenson, M.M. Hussain, U. Klueppelberg, A.J. Norin, H.O. Akman, T. Ozcelik, and O.A. Batuman, *Circulating endothelial progenitor cells in multiple myeloma: implications and significance*. Blood, 2005. **105**(8): p. 3286-94.
49. San Miguel, J.F., N.C. Gutierrez, G. Mateo, and A. Orfao, *Conventional diagnostics in multiple myeloma*. Eur J Cancer, 2006. **42**(11): p. 1510-9.
50. Grethlein, S. and L. Thomas (2010) *Multiple Myeloma*. e-Medicine.
51. Fend, F., A. Tzankov, K. Bink, S. Seidl, L. Quintanilla-Martinez, M. Kremer, and S. Dirnhofer, *Modern techniques for the diagnostic evaluation of the trephine bone marrow biopsy: methodological aspects and applications*. Prog Histochem Cytochem, 2008. **42**(4): p. 203-52.
52. Bain, B.J., *Bone marrow trephine biopsy*. J Clin Pathol, 2001. **54**(10): p. 737-42.
53. Sperr, W.R., A. El-Samahi, M. Kundi, M. Girschikofsky, S. Winkler, D. Lutz, G. Endler, H. Rumpold, H. Agis, C. Sillaber, U. Jager, and P. Valent, *Elevated tryptase levels selectively cluster in myeloid neoplasms: a novel diagnostic approach and screen marker in clinical haematology*. Eur J Clin Invest, 2009. **39**(10): p. 914-23.
54. Schwartz, L.B., *Clinical utility of tryptase levels in systemic mastocytosis and associated hematologic disorders*. Leuk Res, 2001. **25**(7): p. 553-62.
55. Payne, V. and P.C. Kam, *Mast cell tryptase: a review of its physiology and clinical significance*. Anaesthesia, 2004. **59**(7): p. 695-703.
56. Schwartz, L.B., *Tryptase: a mast cell serine protease*. Methods Enzymol, 1994. **244**: p. 88-100.
57. Sommerhoff, C.P., W. Bode, P.J. Pereira, M.T. Stubbs, J. Sturzebecher, G.P. Piechotka, G. Matschiner, and A. Bergner, *The structure of the human betall-tryptase tetramer: fo(u)r better or worse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 10984-91.
58. Hutter, G., S. Ganepola, E. Thiel, and W.K. Hofman, *Inhibition of mast cell tryptase activity. A new therapeutic target against malignancy induced angiogenesis*. bioscience hypotheses, 2008. **1**: p. 213-217.
59. Schwartz, L.B., *Diagnostic value of tryptase in anaphylaxis and mastocytosis*. Immunol Allergy Clin North Am, 2006. **26**(3): p. 451-63.
60. Caughey, G.H., *Tryptase genetics and anaphylaxis*. J Allergy Clin Immunol, 2006. **117**(6): p. 1411-4.
61. Schwartz, L.B., J.W. Yunginger, J. Miller, R. Bokhari, and D. Dull, *Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis*. J Clin Investig, 1989. **83**(5): p. 1551-5.

62. Trabucchi, E., E. Radaelli, M. Marazzi, D. Foschi, M. Musazzi, A.M. Veronesi, and W. Montorsi, *The role of mast cells in wound healing*. *Int J Tissue React*, 1988. **10**(6): p. 367-72.
63. Augustin, H.G., K. Braun, I. Telemenakis, U. Modlich, and W. Kuhn, *Ovarian angiogenesis. Phenotypic characterization of endothelial cells in a physiological model of blood vessel growth and regression*. *Am J Pathol*, 1995. **147**(2): p. 339-51.
64. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. *Nat Med*, 1995. **1**(1): p. 27-31.
65. Alon, T., I. Hemo, A. Itin, J. Pe'er, J. Stone, and E. Keshet, *Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity*. *Nat Med*, 1995. **1**(10): p. 1024-8.
66. Hunt, L.W., T.V. Colby, D.A. Weiler, S. Sur, and J.H. Butterfield, *Immunofluorescent staining for mast cells in idiopathic pulmonary fibrosis: quantification and evidence for extracellular release of mast cell tryptase*. *Mayo Clin Proc*, 1992. **67**(10): p. 941-8.
67. Toda, S., Y. Tokuda, N. Koike, N. Yonemitsu, K. Watanabe, K. Koike, N. Fujitani, Y. Hiromatsu, and H. Sugihara, *Growth factor-expressing mast cells accumulate at the thyroid tissue-regenerative site of subacute thyroiditis*. *Thyroid*, 2000. **10**(5): p. 381-6.
68. Mackey, S., H.B. Pride, and W.B. Tyler, *Diffuse cutaneous mastocytosis. Treatment with oral psoralen plus UV-A*. *Arch Dermatol*, 1996. **132**(12): p. 1429-30.
69. Ribatti, D., A. Vacca, R. Ria, A. Marzullo, B. Nico, R. Filotico, L. Roncali, and F. Dammacco, *Neovascularisation, expression of fibroblast growth factor-2, and mast cells with tryptase activity increase simultaneously with pathological progression in human malignant melanoma*. *Eur J Cancer*, 2003. **39**(5): p. 666-74.
70. Kurukulaaratchy, R.J., W. Karmaus, A. Raza, S. Matthews, G. Roberts, and S.H. Arshad, *The influence of gender and atopy on the natural history of rhinitis in the first 18 years of life*. *Clin and Exp Allergy*, 2011. **41**(6): p. 851-9.
71. Arbes, S.J., Jr., P.J. Gergen, B. Vaughn, and D.C. Zeldin, *Asthma cases attributable to atopy: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **120**(5): p. 1139-45.
72. Lin, P., *Plasma cell myeloma*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2009. **23**(4): p. 709-27.
73. Nelson, M., R.D. Brown, J. Gibson, and D.E. Joshua, *Measurement of free kappa and lambda chains in serum and the significance of their ratio in patients with multiple myeloma*. *Br J Haematol*, 1992. **81**(2): p. 223-30.
74. Wenzel, S.E., A.A. Fowler, 3rd, and L.B. Schwartz, *Activation of pulmonary mast cells by bronchoalveolar allergen challenge. In vivo release of histamine and tryptase in atopic subjects with and without asthma*. *Am Rev Respir Dis*, 1988. **137**(5): p. 1002-8.

75. Jonsson, M. and J. Carlson, *Computer-supported interpretation of protein profiles after capillary electrophoresis*. Clin Chem, 2002. **48**(7): p. 1084-93.
76. Rajkumar, S.V. and R.A. Kyle, *Multiple myeloma: diagnosis and treatment*. Mayo Clin Proc, 2005. **80**(10): p. 1371-82.
77. Demasi, A.P., C. Furuse, A.B. Soares, A. Altemani, and V.C. Araujo, *Peroxiredoxin I, platelet-derived growth factor A, and platelet-derived growth factor receptor alpha are overexpressed in carcinoma ex pleomorphic adenoma: association with malignant transformation*. Hum Pathol, 2009. **40**(3): p. 390-7.
78. Pei, X.Y., Y. Dai, and S. Grant, *Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(11): p. 3839-52.

ANEXOS

Dados do Grupo Teste

Legenda:

Phad: concentração de IgE específico para alérgenos inalantes;

Trip: concentração de triptase;

Unidades:

IgG, IgA IgM: mg/mL;

Kappa, Lambda: mg/mL;

Componente Monoclonal: g/dL;

Phadiatop: kUA/L;

Triptase: ng/mL.

Número	Idade	Sexo	IgG	IgA	IgM	Kappa	Lambda	R:KL/LL	CM	GM	Phad	Trip
177183	63	M	2160	1510	264	2360	960	0,699	0,11	GK	1,57	4,55
178406	56	F	4070	275	354	3150	1660	0,764	0,25	GK	0,08	6,02
206488	78	M	776	146	1570	612	1370	0,334	0,88	ML	0,06	9,01
211209	87	M	609	62	2170	474	2010	0,046	1,8	ML	0,1	4,58
212104	82	F	5210	34	13	5500	30	17,629	4,3	GK	0,07	2,26
216354	80	F	591	3640	20	1550	225	5,679	2,09	AK	1,44	1,32
216439	83	M	4860	49	14	98	7880	0,006	4,06	GL	0,06	15,6
216796	68	F	1280	204	291	1120	689	0,948	0,11	GL	0,12	3,69
217131	86	F	888	72	60	1060	147	9,227	0,57	GK	0,07	4,23
220696	88	M	1700	453	20	1810	340	5,503	1,19	GK	0,07	9,76
222036	61	M	1080	249	62	5	2	2,894	0,38	C. Livres	0,08	9,37
230941	72	M	1020	101	836	1490	379	2,473	0,53	MK	0,12	5,98
232356	79	M	502	63	3440	285	2930	0,463	2,29	ML	0,06	14,9
234679	71	M	970	324	662	1400	435	2,331	0,41	MK	0,06	8,48
234682	89	M	524	280	78	510	316	0,697	0,02	GK	0,72	8,61
235648	73	F	903	183	193	639	654	0,899	0,59	GK	0,06	6,17
236436	76	F	451	51	359	774	188	8,651	0,1	MK	0,05	19,9
238736	84	M	1170	447	202	1030	598	0,585	0,05	GK	0,47	5,78
240257	86	M	702	135	2360	2480	345	1,486	1,17	MK	0,06	16,1
240952	75	M	2960	222	29	220	241	2,385	1,92	GK	0,06	5,05
241696	88	F	3260	70	47	3900	186	2,102	2,66	GK	0,08	7,58
244934	72	M	3540	303	459	1680	2280	0,257	0,15	ML	0,04	6,96
245393	74	M	570	192	201	584	351	2,395	0,07	MK	0,07	3,43
250138	99	F	945	367	303	959	456	0,873	0,16	MK	0,08	5,69
251824	76	F	2360	124	136	574	929	0,009	1,43	GL	0,06	5,72
252253	56	F	2920	378	641	2300	1950	0,711	0,18	GK	0,06	6,32
253240	78	M	1810	713	93	1270	906	0,606		AL	4,31	4,97
253974	78	F	1350	1110	77	1140	945	0,525	0,3	AL	0,15	
254668	70	M	1740	609	275	1370	1040	2,179	0,04	GL	0,25	4,48

258691	88	M	757	141	27	768	252	0,978	0,12	GK	0,14	6,98
261816	76	M	3320	43	11	230	2780		7,1	GL	0,06	5,52
262030	68	M	877	300	217	937	359	0,785	0,07	MK	3,87	6,18
263959	90	F	1310	106	49	265	1110	0,654	0,76	GL	0,06	5,27
264275	77	F	1100	678	92	1060	701	0,534	0,16	C. Livres	0,12	4,24
265342	80	F	1480	249	75	1220	308	2,579	0,6	GK	0,84	13,9
265620	72	F	218	4130	8	175	1340	0,029	3,94	AL	0,07	7,8
266243	82	M	2560	740	107	2310	1370	0,708	0,16	GK	0,08	9,22
266261	93	M	1930	269	55	545	1350	0,475	1,27	GL	0,09	9,02
268926	83	F	948	74	22	637	1440	0,01	0,17	C. Livres	0,06	7,92
270337	84	M	721	714	14	868	209	2,658	0,45	AK	0,14	6,98
270802	85	F	388	6070		303	2460	0,051	4,31	AL	0,07	7,65
272468	60	F	728	63	14	470	723	0,042	0,21	C. Livres	0,07	14,3
272960	62	M	4210	30	26	265	3800	0,552	2,64	GL	0,19	14,9
273658	60	M	1150	725	224	1150	572	1,083	0,02	GK	0,18	10,7
274839	76	F	896	563	83	835	402	0,997	0,09	AK	0,18	8,73
275827	71	F	804	229	333	934	403	0,651	0,07	GK	0,81	3,64
276504	94	F	1550	270	53	1450	521	0,397	0,06	GK	0,08	2,3
277889	80	F	1420	192	66	1600	311	0,89	0,55	GK	0,07	12,9
281450	56	M	1920	1520	122	1880	1340	0,434	0,01	AL	0,17	3,34
281494	72	F	2150	674	328	1800	1090	0,6	0,1	MK	0,84	9,41
282340	88	M	1650	382	17	1810	372	4,354	0,91	GK	0,07	10
282437	54	F	5660	98	38	7950	120	564,375	4,15	GK	0,05	3,18
282630	75	M	1780	518	79	1720	841	0,844	0,12	GK	0,09	16,4
282877	80	F	569	1040	54	1130	193	4,063	0,32	AK	0,07	3,85
283033	70	M	2180	746	303	2100	1150	0,732	0,25	GK	0,08	5,83
283692	78	M	1190	114	50	1080	300	0,888	0,26	GK	0,06	4,3
285082	65	M	900	471	697	904	805	0,482	0,46	ML	0,06	6,24
285949	83	F	1180	499	33	973	567	0,474	0,31	AL	0,7	8,03
286265	76	M	8540	17	8	10700	41	0,976	6,7	GK	0,19	17,2
286319	87	F	1100	577	98	1310	444	1,579	0,06	GK	0,08	7,81
286946	65	M	1500	151	88	667	837	1,061	0,46	GL	0,22	5,9
287254	60	M	1120	623	83	990	562	0,564	0,09	GK	0,2	10,3
288322	75	M	870	246	89	737	316	0,824		GK	0,11	3,83
288466	70	F	812	882	44	968	219	1,413	0,53	AK	0,07	4,76
289484	92	M	847	108	79	655	365	2,608	0,08	C. Livres	0,08	9,69
294027	83	M	2710	493	370	2220	1360	0,542	0,02	GK	0,45	8,62
297266	65	M	1150	161	2370	3090	416	0,658	1,3	MK	0,21	9,08
298164	78	M	411	602	8	741	161	10,021	0,21	AK	0,06	10,2
298219	75	F	2170	577	123	1850	1060	0,673	0,09	GK	4,14	4,43
300143	82	M	1670	370	80	1500	737	1,096	0,17	GK	0,02	5,63
300937	80	M	2650	1860	89	2290	1680	0,341	0,86	AL	10,4	5
301760	86	M	1300	305	88	1070	618	0,495	0,14	GK	0,15	1,38
302714	59	M	2650	27	20	3760	30	101,25	1,71	GK	0,06	4,29
302762	51	M	2770	531	87	2300	1150	0,888		GK	0,1	3,91
302921	76	M	1420	533	190	997	1130	0,206		GK	0,48	11,9

303524	51	M	1570	225	59	1370	538	0,49	0,51	GK	6,3	5,13
305275	78	F						1,414	0,1		0,15	1,89
305486	80	F	579	1550	27	2620	169	2,294	0,77	AK	0,1	3,11
305759	74	M	1470	388	139	1430	523	2,198	0,07	GK	0,09	5,24
306455	83	M	1440	586	335	1530	658	1,39	0,13	MK	0,14	59,5
307622	89	M	1760	136	92	664	972	0,415	0,65	GL	0,39	7,72
308113	69	M	1580	314	27	1050	648	0,743		C. Livres	0,07	4,45
308714	84	M	1190	187	54	882	608	0,398	0,09	GL	0,07	6,18
308886	67	F	1400	149	100	555	694	0,494	0,32	GK	0,14	6,53
309104	76	M	1300	493	35	916	670	0,552	0,08	GL	0,1	8,86
309775	70	M	1380	180	70	464	818	0,39	0,71	GL	0,38	5
310211	83	F	870	318	140	916	371	2,263		GK	0,06	4,61
310754	80	M	763	93	7890	3370	437	1	4,48	MK	0,1	4,49
310924	87	F	1880	297	134	2250	277	4,797	0,94	GK	0,07	11,2
310945	84	F	1150	122	1340	2050	395	8,207	0,82	MK	0,05	6,04
310964	89	F	1190	672	83	910	895	1,006	0,04	GL	0,09	5,36
310967	89	M	1030	173	42	483	660	0,874	0,18	GL	0,07	6,78
310987	77	F	1210	86	73	584	554	0,301	0,24	GL	0,07	6,81
311082	69	M	1600	298	54	1320	608	1,852	0,04	GK	0,06	3,41
311191	68	F	876	221	219	841	439	0,611	0,05	MK	1,11	2,36
311970	74	M	876	90	35	507	491	71,25	0,11	GL	0,07	8,76
312033	89	M	674	45	7390	3780	163	6,157	4,21	MK	0,08	10,9
313440	72	M	262	1460	35	219	752	0,131	1,1	AL	0,1	6,13
313827	79	M	1250	151	104	1120	42	0,819	0,27	GK	0,08	6,23
314273	62	M	2240	557	93	1650	1050	1,436		C. Livres	0,97	11,7
314489	82	M	874	368	325	767	767	0,389	0,04	GL	0,08	4,66
314624	81	M	1170	577	28	1030	654	2,168		C. Livres	0,06	6,09
315392	96	F	1380	570	56	935	744	0,673	0,08	GL	0,13	3,55
315531	75	M	1360	529	65	1320	587	2,04	0,03	GK	0,03	8,21
315824	81	M	1880	303	62	2200	389	8,617	0,92	GK	0,06	2,3
315920	71	F	9260	12	8	78	6370	0,034	4,85	GL	0,06	2,87
315945	93	F	1270	639	138	1490	489	2,495	0,15	GK	0,02	7,33
315999	70	M	1760	195	70	608	913	0,808	0,8	GL	0,18	3,54
316000	87	F	620	142	103	571	334	2,404	0,06	GL	0,05	7,8
316334	66	M	1220	598	180	958	1030	0,911	0,03	GL	0,42	5,67
316734	76	M	1180	404	91	1230	382	2,283	0,05	AK	0,02	6,03
317946	87	M	853	158	79	737	344	1,067	0,17	GK	0,10	3,68
318363	68	M	681	3490	27	155	1350	0,109	2,68	GL	0,02	4,8
318702	59	F	592	140	199	665	237	1,52	0,04	GK	0,03	3,91
319686	89	F	3080	353	36	1550	2200	0,05	0,97	GL	0,07	4,98
319691	69	M	1860	374	200	1640	860	1,381	0,11	GK	0,02	14,2
320221	68	F	944	617	45	1060	381	1,136	0,33	AK	0,01	4,49
323262	86	F	1520	363	130	1260	770	0,826	0,08	GK	0,04	4,77
323280	94	F	972	393	79	897	376	1,31	0,1	GK	0,03	5,99
323979	96	F	1040	192	71	970	391	1,185	0,34	GK	0,07	2,38
324685	58	F	844	64	61	689	189	5,465	0,36	GK	0,02	2,15

325795	70	F	1670	57	49	1310	188	1,097		GK	0,06	5,99
326219	83	F	1160	448	58	1010	414	1,551	0,01	GK	1,19	7,47
326401	89	M	1140	215	69	916	299	2,746	0,38	GK	0,07	3,85
326512	86	F	560	49	24	808	52	1,003	0,76	GK	0,06	0,9
326545	84	M	1260	642	61	1430	342	1,711	0,12	GK	0,06	4,77
326608	78	M	3000	84	96	2870	176	9,72	2,1	GK	0,08	4,16
326832	82	F	1770	204	91	1890	386	2,355	0,83	GK	0,06	5,71
327402	65	F	607	47	218	729	213	1,444	0,08	MK	0,12	16,9
327403	58	F	1090	669	104	1050	611	1,261		C. Livres	13,1	3,04
327453	102	M	1280	187	235	1110	593	1,504	0,1	MK	0,11	5,62
327849	81	F	1530	480	70	1280	594	1,285	0,01	GK	0,06	3,95
328140	73	M	1370	489	103	1180	537	1,344	0,09	GK	0,10	17,3
328412	85	F	1060	220	85	845	510	1,705	0,03	GK	0,07	2,18
329181	78	F	2860	1300	394	3010	1260	1,276	0,53	AK	0,08	2,26
329620	74	M	1570	279	289	1470	936	1,734	0,21	GK	0,22	16,9
329685	66	F	1010	699	73	705	605	0,17	0,14	AL	0,06	3,27
329987	81	M	906	125	185	819	394	1,505	0,03	MK	0,09	5,48
330360	97	F	727	276	74	444	738	0,814	0,19	GL	0,12	6,07
330377	91	M	2550	1740	140	2300	1260	0,74	0,12	C. Livres	0,07	7,39
331245	73	M	1260	240	126	1100	331	1,459	0,08	GK	0,07	9,62
331428	88	M	1780	107	80	1060	1050	0,267	0,37	GL	0,06	5,83
331562	84	F	2520	657	108	1660	1180	0,838	0,1	GK	0,20	3,2
332657	94	F	1870	675	206	1700	836	0,487	0,03	GK	0,06	8,8
332727	71	F	3290	84	38	384	2470	0,6	1,98	GL	0,06	3,2
333460	54	F	1750	161	77	1720	225	1,407	0,77	GK	0,10	12,6
334767	86	F	532	1860	16	1520	131	8,254	0,28	AK	0,06	8,77
335406	77	M	717	289	52	632	301	1,372	0,14	GK	0,12	5,26
337537	84	M	2130	423	84	1910	559	14,65	0,34	GK	0,09	11,6
338773	65	M	2180	152	49	408	2280	0,892	1,15	GL	0,09	5,49
339278	57	M	904	339	588	1310	357	1,261	0,26	MK	0,15	5,15
340903	69	M	1400	281	26	1010	555	0,972	0,09	GL	0,07	4,99
340920	78	F	2160	69	48	1910	139	18,333	1,34	GK	0,06	4,39
341213	85	M	2270	120	45	672	1140	0,573	1,03	GL	0,07	9,8
341324	56	M	2750	1330	250	2650	1600	0,675	0,09	GK	7,23	5,02
341325	85	M	1220	472	71	1130	536	0,63	0,35	GK	0,10	23,7
341601	70	M	1270	265	88	437	666	0,439	0,17	GK	0,06	6,15
341907	70	M	5340	69	16	4330	118	383,858	4,13	GK	0,06	3,63
342172	87	M	1050	612	98	793	612	0,424	0,02	GL	0,18	5,32
342485	86	M	2690	525	98	1890	1300	1,293	0,07	GK	0,19	11,9
343042	66	M	1380	260	124	1120	596	0,871	0,19	GK	0,29	5,35
344190	67	M	1220	194	72	981	482	0,725	0,05	C. Livres	0,05	2,6
345912	60	M	634	65	2160	2950	263	9,918	1,29	MK	0,08	4,5
346156	67	M	1710	161	121	1480	324	1,508	0,52	GK	0,07	4,1
346415	81	M	1040	415	97	842	723	10,571	0,04	GK	0,23	11,3
347480	85	M	1060	236	382	1120	662	0,922	0,16	GK	0,06	7,66
347578	59	F	1810	291	101	1350	320	1,419	0,81	GK	0,06	12,5

347768	63	M	1040	358	183	351	697	0,725	0,03	GL	1,59	2,02
347852	78	M	1120	706	241	1060	619	0,751	0,08	MK	0,17	5,77
348293	79	F	1670	182	43	748	929	0,211	0,75	GL	0,06	5,27
348976	47	F	1480	285	1600	1930	1560	0,237	0,16	MK	2,41	3,19
350207	57	M	1280	217	219	1190	665	0,464	0,04	GK	0,09	2,49
350443	71	F	1150	170	133	1070	481	0,569	0,13	GK	0,06	11,8
352501	84	F	1700	185	257	922	905	0,161	0,35	GL	0,06	7,49
352809	69	F	1170	758	98	991	475	0,869	0,11	C. Livres	0,06	7,47
353633	78	M	1130	302	820	1690	518		0,59	MK	2,36	4,45
354354	76	F	700	1400	53	1420	249	4,63	0,56	AK	3,39	4,21
354875	87	M	327	56	27	298	4090	0,064	0,62	C. Livres	0,07	4,86
355150	79	F	1300	242	347	1350	493	0,983	0,05	GK	0,06	7,63
355692	63	M	1130	199	486	1180	639	0,377	0,12	MK	0,07	3,78
356601	88	M	1510	228	29	609	991	0,487	0,39	GL	0,06	16
357247	79	M	1490	312	203	1060	629	0,636	0,15	GL	0,19	6,01
357769	73	F	774	329	71	751	374	0,62	0,05	GL	0,07	1,33
358221	48	M	1730	95	158	1520	592	2,447	0,28	GK	0,12	7,84
359003	66	M	1380	123	85	889	265	4,581	0,43	GK	0,07	7,22
359370	72	M	1000	342	103	941	336	2,927	0,2	GK	0,63	6,07
359597	86	M	870	113	1380	1660	574	1,989	0,53	MK	0,23	6,51
360871	63	F	886	289	4190	3620	181	2,178	2,06	MK	0,05	4,39
360873	74	F	686	215	192	806	438	0,882	0,06	GK	0,09	5,44
361685	69	M	1150	186	92	820	714	2,029	0,08	GL	0,06	5,35
362483	79	F	1230	219	124	1380	478	0,645	0,09	GK	0,10	1,12
364154	64	M	8050	13	20	141	5530	0,008	5,15	GL	0,06	1,03
364948	47	F	1560	656	335	1720	636	0,739	0,5	GK	0,11	3,38
365621	74	M	941	47	1750	2150	398	2,249	0,74	MK	0,06	16,7
367155	71	F	1950	121	145	2470	243	9,826	0,93	GK	0,06	4,05
367167	66	M	1790	182	128	1420	347	1,19		GK	0,06	4,88
367712	68	M	1690	209	104	1570	363	0,617	0,38	GK	0,10	6,58
367934	59	F	1640	136	175	534	918	0,087	1,16	GL	0,06	4,83
368133	75	M	596	215	45	596	269	0,891	0,06	GK	0,07	4,59
369208	49	F	1350	133	57	1340	346	0,815	0,39	GK	21,7	7,97
369376	75	M	1080	422	209	977	633	0,867	0,11	GL	0,12	2,46
369457	90	M	1320	662	60	1220	711	0,486	0,14	GK	0,08	7,39
370319	82	M	684	1700	56	579	1430	0,234	0,84	AL	0,05	7,45
370343	66	F	869	627	65	833	418	0,642	0,19	AK	0,06	1,68
370532	80	F	726	121	474	899	403	3,636	0,16	MK	0,09	2,88
370823	74	M	732	250	29	685	328	0,548	0,11	GK	0,14	4,06
371877	69	M	1470	1030	278	1300	1760	0,391	0,11	GL	0,22	6,45
372300	84	M	1920	241	95	2060	403	0,872	0,89	GK	0,06	6,66
372944	69	M	1900	69	83	1620	121	1,012	1,1	GK	0,05	7,3
376351	88	M	1750	295	110	1530	629	1,198	1,05	GK	0,10	14
378372	76	M	1050	380	68	1040	370	1,143	0,02	AK	0,05	7,12
602366	74	F	1550	397	141	1370	632	0,64	0,05	GK	8,72	1,5
602793	74	M	443	4670	8	345	2450	0,104	3,33	AL	0,06	19,9

602854	77	M	717	139	419	1160	333	1,618	0,34	MK	0,41	5,43
605586	81	F	1630	36	55	2180	85	19,364	1,1	GK	0,03	5,69
606635	72	F	4750	358	93	3930	1370	1,257		GK	0,15	22,8
606709	73	M	538	8830	39	459	6070	0,034	7,54	AL	0,11	3,78
607895	63	M	1820	99	108	2140	206	1,936	0,75	GK	0,06	3,56
610420	66	M	155	3570	331	180	2290	0,35	0,24	GL	0,07	6,62
610455	62	F	1170	199	60	717	937	0,164	0,37	GK	0,07	17,4
615197	76	M	1030	247	668	1450	333	1,984	0,19	MK	1,02	5,31
616224	66	M	1700	1110	53	2020	732	2,031	0,06	GK	0,07	5,62
616987	74	M	857	1820	26	596	1830	0,012	0,48	AL	0,06	8,2
618724	64	M	2190	98	32	605	1280	0,25	1,24	GL	0,17	8,92
618726	80	F	1000	395	100	963	483	0,789		GK	1,70	2,62
620090	41	M	2850	352	125	2540	1060	1,201	0,26	GK	0,16	6,13
620725	72	M	1720	532	66	1580	709	1,008	0,04	AK	0,13	10,4

Dados do Grupo Controlo

Número	Idade	Sexo	Phad	Trip
330705	26	F	0,97	4,1
350351	28	M	0,97	8,56
359591	41	M	0,95	1,79
367730	42	F	0,86	7,42
369110	31	F	0,94	3,9
374719	18	M	1,42	4,81
376425	54	F	1	9,9
349397	29	M	0,87	10,3
612278	27	F	0,89	3,76
613805	51	M	1,14	6,82
621642	35	F	0,96	4,85
309891	20	F	13,3	2,74
310449	28	F	13,1	5,08
327808	44	F	11,7	6,04
340954	24	M	12,1	8,54
353664	30	M	12,1	4,29
356093	37	M	11,3	7,88
358907	55	M	12,6	6,89
361442	30	M	12,2	4,5
378069	36	F	10,3	5,49
617296	28	F	13,4	6,23
232847	25	F	278	6,37
333734	49	M	130	2,39
336041	45	F	849	3,67
349125	25	M	259	3,97
354071	20	F	139	3,48
359760	18	F	120	4,04
373609	34	F	110	5,12
612467	34	F	241	6,56
618644	40	M	130	6,16
266344	60	F	0,05	2,92
266373	55	F	0,05	8,06
274217	43	F	0,06	3,68
300754	48	F	0,22	1,09
301924	35	F	0,06	5,23
302372	65	M	0,05	4,31
302845	40	F	0,06	0,8
303005	44	F	0,05	1,31
303035	20	M	0,28	1,74
303722	23	F	0,06	1,04
303732	37	M	0,06	5,69
303772	57	F	0,07	3,83

304274	23	F	0,07	1,33
304458	47	F	0,05	1,1
304461	72	M	0,05	3,95
304905	40	F	0,06	8,15
305228	19	M	0,08	1,55
305245	44	F	0,11	0,8
305724	53	M	0,08	4,34
305904	72	F	0,06	5,08
306241	24	F	0,11	2,12
306444	21	M	0,08	5,02
306821	51	F	0,04	5,38
308101	18	F	0,01	3,81
308139	30	M	0,05	2,36
308155	55	F	0,08	7,47
308243	32	F	0,03	0,9
309184	24	F	0,03	0,7
309868	63	M	0,06	1,43
309892	34	F	0,01	4,75
310471	19	F	0,02	2,14
310870	48	F	0,01	4,18
324243	43	F	0,17	4,53
328415	20	M	0,13	4,55
375472	27	F	0,06	1,61
379271	33	F	0,05	1,26
600403	55	F	0,15	8,8
608192	50	F	0,15	7,42
618725	40	M	0,08	3,66
618808	50	F	0,05	1,96
619846	35	M	0,09	2,6
620635	34	M	0,35	4,28
620644	73	F	0,05	1,78
620766	47	F	0,25	0,95
620773	70	M	0,11	1,12
621293	66	F	0,13	5,82
621509	60	F	0,01	1,94