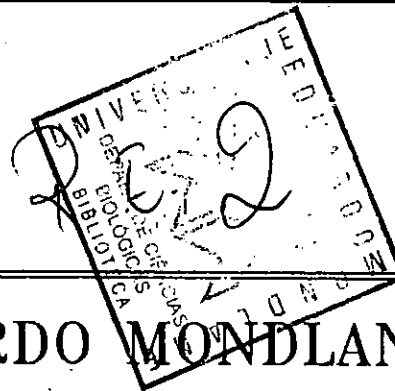
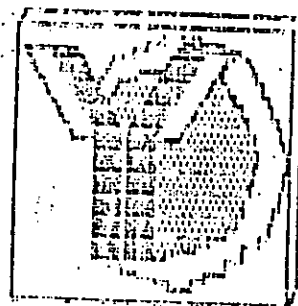


BIO-141



UNIVERSIDADE EDUARDO MONDLANE
Faculdade de Biologia

TRABALHO DE LICENCIATURA



TITULO: Estudo de valores normais de leucocitos e de sub-populações de linfócitos T em indivíduos mocambicanos adultos sem manifestações aparentes de doença.

Estudante: Cornelio P. Balane
Supervisor: Dr. Fernando de la Cruz

Maputo, Dezembro de 1990

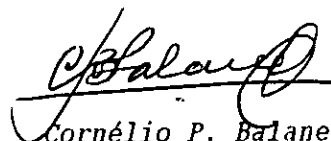
Ao

*meu tio Jorge Lucas Balane
e à
minha mãe Celestina Cuco*

Agradecimentos

Para que este trabalho pudesse ser realizado contou com apoio de diferentes instituições e individualidades. A essas instituições e individualidades gostaria de expressar os meus profundos agradecimentos especialmente ao Dr. Fernando De la Cruz, pela supervisão deste trabalho, à FUMIS (Fundação Moçambicana de Investigação em Saúde), por ter financiado este projecto; ao Dr. César Palha de Sousa, pelo apoio que deu na revisão deste trabalho; ao L.N.H.A.A. (Laboratório Nacional de Higiene de Aguas e Alimentos) e aos Serviços de Anatomia Patológica do H.C.M. (Hospital Central de Maputo), pela assistência e facilidade no uso do seu equipamento e reagentes sem os quais não seria possível a realização da parte prática deste trabalho; aos Centros de Saúde da Polana e do Alto-Maé e ao Banco de Sangue do H.C.M. que, gentilmente, forneceram as amostras de sangue. Seria injusto esquecer-me, da Dr. Lúcia Barquet, e do Dr. Rui de Paula Silva, pela ajuda que prestaram no tratamento de dados.

Por último agradeço a faculdade de Biologia, e ao Instituto Nacional de Saúde, que em todos os momentos souberam dar o apoio material, moral e científico para a efectivação deste trabalho e os meus agradecimentos são extensivos a todas as pessoas e amigos que directa ou indirectamente, contribuíram para a realização do presente estudo.


Cornélio P. Balane

Errata

Nos apêndices, anexos I, no processo de numeração da páginas ficou omitida a página xx, sem no entanto alterar a sequência dos pontos tratados e por consequência o conteúdo mantém-se inalterado. Com a referida omissão, a parte do índice referente a esta secção, passa a não corresponder com a sequência numérica das páginas no texto. Apartir da página xix, as páginas estão adiantadas em uma unidade. Assim o índice errado é:

10. ANEXOS I

10.1. Protocolos.....x-xix

10.2. Reagentes.....xxi-xxiii

11. Anexos II

11.1. Bancos de dados.....xxiv-xxv

11.2. Comentários do teste Chi-Quadrado.....xxvi-xxxvi

O índice correcto, considerando as páginas corrigidas seria:

10. ANEXOS I

10.1. Protocolos.....x-xix

10.2. Reagentes.....xx-xxii

11. Anexos II

11.1. Bancos de dados.....xxiii-xxiv

11.2. Comentários do teste Chi-Quadrado.....xxv-xxxv

Abreviaturas, Símbolos e Convenções

APC	Antigen Presenting Cells
CSLT	Concentração de Diferentes Subpopulações de Linfócitos T no sangue total em mm ³
CD4/CD8	Razão entre os linfócitos com marcador CD4 e com marcador CD8.
CD	Cluster of Differentiation (adoptado pela Leukocyte Differentiation Atigen Workshop, W.H.O.)
CDAL	Concentração Absoluta dos Diferentes tipos de Leucócitos
D.F	Degrees of Freedom liberdade (Graus de liberdade)
F1,F2,F3	Símbolos dos grupos etários de 15-24, 25-34 e >35 anos de idade respectivamente, dentro do sexo feminino.
IL-1	Interleukin-1
IL-2	Interleukin-2
lim. inf	limite inferior (nos intervalos de confiança)
lim. sup	limite superior (nos intervalos de confiança)
MHC	Major Histocopatibility Complex
M1,M2,M3	Símbolos dos grupos etários de idade:15-24, 25-34 e >35 anos de idade respectivamente, dentro do sexo masculino.
MIN	Mínimo
Max	Máximo
NL	Concentração de leucócitos (Nº de células/mm ³)
PM	Percentagem de polimorfonucleares
PLT	Percentagem de Linfócitos T

PSL	Percentagem das diferentes Subpopulações de Linfócitos (T4 e T8)
p	valor da probabilidade do teste de t de student (valido somente dentro de tabelas)'.
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (meio de cultura e de sustentação de células).
t	valor de t dado pelo teste de student (valido só dentro dsa tabelas)
SUB-POPULAC	Sub-populações
SD	Standart desviation (desvio padrão)
VL	Viabilidade de Linfócitos

Sumário

80 indivíduos adultos (≥ 15 anos), sem evidência de sintomas de doença, foram estudados com objectivos de determinar os valores de concentração de linfócitos totais, e sub-populações de linfócitos T, no sangue periférico de indivíduos normais e seus intervalos de referência. Do número estudado metade foi do sexo masculino (doadores de sangue, banco de sangue do H.C.M.) e a outra metade do sexo feminino (mulheres atendidas nas consultas de planeamento familiar nos centros de saúde da Polana e Alto-maé).

Dos 7 ml de sangue venoso, colhidos de cada indivíduo incluído no estudo, foram feitas as seguintes análises: (1) determinação da concentração de leucócitos totais, por uma contagem na câmara de Neubauer, (2) fórmula leucocitária, por uma contagem diferencial "coloração de Romanowsky", (3) separação de linfócitos, pelo método de centrifugação de gradiente de densidade em Histopaque "Sigma Chemicals" e (4) identificação e contagem de subpopulações de linfócitos T, utilizando a técnica APAAP "DAKO Laboratories, USA" e visualizando num microscópio de luz convencional.

A todas as amostras se fez previamente o rastreio de anticorpos anti-HIV utilizando um teste ELISA comercial descartando-se todas aquelas que revelaram ser positivas.

Criando uma base de dados em microcomputador e com auxílio do programa Lotus 1-2-3 e a sua folha de cálculo, determinaram-se os valores de concentração de leucócitos totais, linfócitos totais e subpopulações de linfócitos T, assim como a razão entre estas subpopulações estudadas. Agruparam-se os indivíduos por sexo compararam-se os mesmos para os valores médios de concentração das populações celulares aplicando-se-lhes o teste de t de student que revelou para $p > 0.05$ diferença significativa de valores médios obtidos para cada grupo.

Com o auxílio do programa MICROSTAT, as populações celulares foram aferidas quanto á normalidade de distribuição dos seus valores utilizando o teste de chi-quadrado para a qualidade de ajuste a uma distribuição normal. Em consequência estimaram-se a média e respectivos desvios-padrão para estabelecimento dos limites dos intervalos de referência. O efeito da idade nos valores de concentração das populações celulares estudadas, foi avallado pelo teste t de student depois de agrupados os indivíduos, grupos de idade 15-24 anos; 25-34 anos e > 35 anos, analisando-os por sexo e por grupos etários em sexos diferentes.

O sexo feminino apresentou uma diferença significativa entre os grupos etários 15-24 e 25-34 anos para $p < 0.05$ quanto aos valores médios de concentração de linfócitos T11(CD11); linfócitos T4(CD4); linfócitos T8(CD8) e linfócitos totais atribuída a factores não controlados nos indivíduos estudados. Na comparação por grupos etários de sexos opostos só se encontrou diferenças significativas no grupo dos 15-24 anos.

As variações nas contagens de linfócitos T4, T8 e T11, foram controladas pela determinação da taxa de reproductibilidade, que para todos os fenótipos celulares a 90% e portanto por nós considerado admissível.

Os valores obtidos neste estudo sendo baixos em relação a outros reportados por outros autores chama a atenção para a relevância deste estudo e está de acordo com as variações já descritas numa região geográfica para outra. Estudos na sua sequência poderão comprovar a aplicabilidade dos valores obtidos, no diagnóstico clínico de certas imunodeficiências facilitando o refinar de limitações da técnica para uso nas condições do país.

INDICE

PRIMEIRA PARTE

Pg.

1. Sumario.....	7
2. Objectivos.....	17

SEGUNDA PARTE

3. Metodologia de estudo

3.1. Amostragem.....	17
3.2. Leucograma.....	18
3.3. Contagem diferencial.....	19
3.4. Isolamento linfócitos.....	19
3.5. Teste de viabilidade.....	20
3.6. Identificação de sub-populações de sub-populações de linfócitos.....	21
3.8. Reproducibilidade.....	24
3.7. Cálculos.....	24
3.9. Limitação.....	27
3.10. Análise estatística.....	28

TERCEIRA PARTE

4. Resultados.....	30
5. Dificuldades carados.....	44
6. Discussão.....	46
7. Conclusões.....	54
8. Recomendações.....	56
9. Referências bibliográficas.....	57

APENDICES

10. ANEXOS I

10.1. Protocolos.....	x-xiv
10.2. Reagentes.....	xxi-xxiii

11. Anexos II

11.1. Bancos de dados.....	xxiv-xxv
11.2. Comentários do teste Chi-Quadrado....	vi-xxxvii

PRIMEIRA PARTE

Introdução

Pelo papel das células linfoides na defesa imunitária contra várias infecções, no organismo, o seu estudo merece grande destaque. Elas são de dois tipos designadamente: linfócitos B porque são originários da Bursa de Fabricius nas aves e provavelmente da medula óssea nos mamíferos e os linfócitos T que se originam na medula óssea nos mamíferos mas que completam o seu desenvolvimento e maturação no timo. [1,2,3,4].

Os linfócitos B aqueles de cujo desenvolvimento resulta em células produtoras de anticorpos, estas últimas moléculas proteicas que se ligam aos antígenos resultando na sua destruição e remoção.

Quando uma célula B reconhece um antígeno circulante no sangue, nos nódulos linfáticos ou mesmo exposto na superfície da membrana celular dum célula infectada, ela fica activada. Porém ela divide-se dando lugar a expansão dum clone de células B, todas portadoras de moléculas (anticorpos) que funcionam como receptoras específicas para o antígeno que deu lugar ao estímulo. O resultado final do desenvolvimento e diferenciação dos linfócitos B são as células chamadas plasmócitos (células de vida curta), ricas em protoplasma, capazes de produzir activamente anticorpos e outras células conhecidas como células de memória (de vida longa), cuja função será responder perante futuros estímulos do mesmo antígeno. Segundo indica o seu nome, estas células de memória permanecem em circulação por muitos anos, prontas para montar uma resposta rápida e eficiente, perante um outro desafio do mesmo antígeno que as originou [1,2,3,4].

A classificação e função das células T é complexa. A maior parte das células T não podem reconhecer um antígeno livre circulante no

sangue ou no nódulo linfático, podendo somente responder a um antígeno que esteja ligado à superfície de uma célula em determinadas condições. A substância estranha, deve ser exibida por uma célula, juntamente com uma das proteínas da célula hospedeira: moléculas codificadas por fragmentos do DNA, formando o que se conhece como "Major Histocompatibility complex (MHC)" ou Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH). Para que se desencadeie uma resposta imune, o receptor antigénico presente nas células T, deverá reconhecer o antígeno em simultâneo com a proteína MHC, presentes na superfície da membrana celular da célula infectada. Uma vez que um linfócito T tenha reconhecido um antígeno, ela leva a cabo uma função que depende da sua subclasse. Somente um tipo de células T defende activamente o organismo: as células T citotóxicas "cytotoxic T cells", as quais destroem células infectadas, exógenas ou malignas através de um processo conhecido por lise (destruição das suas membranas). O outro tipo de células T modula a resposta imune, por secreção de mensageiros proteicos ou mesmo por contacto directo das células participantes [4,5].

As células T indutoras "inducer T cells", iniciam e estimulam a maturação dos linfócitos T percursores em células funcionalmente distintas. As células T auxiliares " helper T cells", constituem uma pre-condição para a acção das células T e muitas das células B; tendo reconhecido um antígeno específico eles possibilitam as células T citotóxicas, a destruir as células portadoras do antígeno, e os linfócitos B, a produzir anticorpos apropriados. O quarto tipo dos linfócitos T, T supressores "supressor T cells", abrandam a resposta imune das células B e T, fechando a defesa imune por várias semanas após ter sido activada pela infecção ou estímulo antigénico.

Os linfócitos T auxiliares e supressores interagem dum modo complexo: eles têm efeitos opostos aos T citotóxicos, e na

supressão da resposta imune os linfócitos T supressores também desactivam as células T auxiliares.

É assim que as células T, formam quatro subpopulações numa base funcional, quanto aos marcadores bioquímicos (estruturais), na superfície das suas membranas eles formam somente duas subpopulações principais. Células T4 as quais têm o papel de auxiliares e indutoras e as células T8 desempenhado o papel de supressão e citotoxicidade. As células T4 e T8 são também distinguidas através do tipo de proteína MHC que deverá estar associado ao antígeno, afim de que elas o reconheçam. Assim, as células T8 reconhecem, o antígeno quando associado a proteína MHC da classe I, enquanto as células T4 reconhecem o antígeno em associação com MHC da classe II. Deste modo as células, T8 citotóxicas podem matar células infectadas que sejam portadoras de antígenos específicos para os quais eles possam reconhecer. Em contrapartida, as células T4, só respondem ao antígeno que esteja associado as proteínas MHC da classe II, que são encontradas em células específicas conhecidas como células apresentadoras de antígeno "Antigen presenting cells (APC)" ou Células Apresentadoras de Antígeno APC [1,4,5,6,7,8].

Em situações de infecções de natureza viral assiste-se uma cooperação celular entre os linfócitos B e T. Numa infecção, por exemplo pelo vírus do sarampo, as células APC, processam o antígeno e expressam-no juntamente com as proteínas MHC da classe II. Nestas condições ele é reconhecido pelas células T4. As APC produzem monoquinas (como gama-interferon e interleukin-1 (IL-1)). A IL-1 tem a habilidade de activar as células T que tenham reconhecido o antígeno viral apresentado pela APC, preparando-as para diferenciarem-se e dividirem-se. As células T activadas produzem factores solúveis conhecidas por linfoquinas. Uma das linfoquinas é conhecida por interleukin-2 (IL-2), secretada pelas células T4 e T8. Sob influência da interleukin-2, as células já estimuladas

pelo antígeno e pela IL-1, proliferam em grandes clones de células maduras: células T citotóxicas e supressoras e células T auxiliares. A IL-2 secretada pelas células T4, ou o contacto directo das mesmas células T4 com as B, estimula estas últimas a diferenciarem e proliferarem em grandes clones de células produtoras de anticorpos e de células de memória para casos recorrentes (recidivantes).

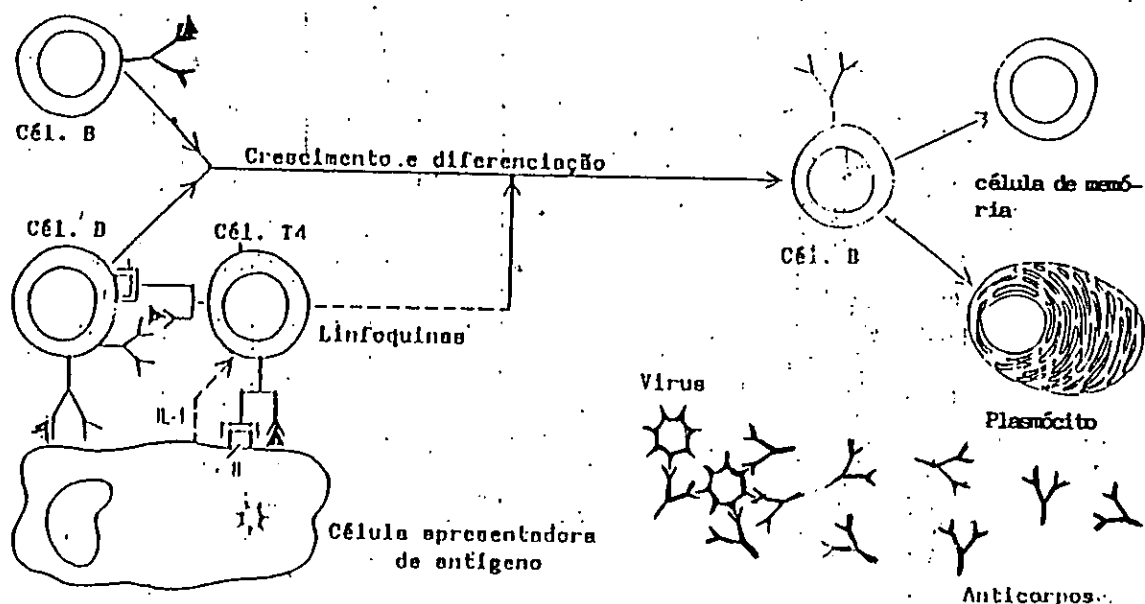


Fig.1 Célula T4 ajuda a célula B, a produzir anticorpos anti-virais. A célula T4 é activada pela interleucina-1 (IL-1), e pelo reconhecimento do antígeno apresentado juntamente com o complexo principal de histocompatibilidade de classe II, na superfície da membrana celular da célula apresentadora do antígeno. Assim a célula T4, liga-se a célula B que também reconheceu o antígeno exibido pelas células apresentadoras de antígeno. A interacção da célula T4 com a célula B, leva ao amadurecimento e diferenciação da última célula em dois tipos de clones celulares: um de células de memória e outro de plasmócitos produtores de anticorpos.

Não existe uma distinção morfológica entre os linfócitos B e T bem como entre as sub-populações dos linfócitos T, ao nível do microscópio óptico [9].

Com o desenvolvimento, da imuno-química já existem técnicas conhecidas como imuno-ensaios capazes de reconhecer antígenos estruturais presentes na superfície das membranas celulares (marcadores bioquímicos), que são específicos para um grupo celular. Pode-se destacar entre as várias técnicas já existentes, as de imuno-fluorescência, (quando os anticorpos são conjugados com material fluorescente) e as imuno-enzimáticas (cujos conjugados são enzimas, como por exemplo, a fosfatasa alcalina e a peroxidase) [9,10].

Técnicas imuno-enzimáticas são baseadas nos anticorpos monoclonais. Os anticorpos monoclonais são aqueles produzidos pela fusão de células do baço dum animal imune com células B malignas, normalmente uma linha de células B derivadas dum tumor (mieloma), que dá lugar a uma célula híbrida conhecida como hibridomas que exhibe características de ambas as células progenitoras. Tais hibridomas conjugam a capacidade de secretar anticorpos da célula do baço do animal imune e a imortalidade da célula maligna [11,12,13,14,15]. A fusão de ambas as células produz-se mediante métodos artificiais criados pelo homem sendo a mais utilizada a fusão pelo polietilene glycol. Outra característica dos hibridomas é que eles podem ser seleccionados dentre as células malignas que deram-lhe origem, mediante o crescimento em um meio de cultura particular onde as células malignas morrem, enquanto que os hibridomas tem capacidade de sobreviver.

Por outro lado é possível isolar hibridomas individuais mediante as técnicas de clonagem e desta maneira produzir grandes quantidades de anticorpo monoclonal por ele secretado, obtendo-se desta forma um anticorpo da mesma classe e subclasse e que tem a mesma

especificidade para um só determinante antigénico, já que o ponto de partida é uma só célula ou clone que deu origem ao hibridoma. Além disso, através da tecnologia dos anticorpos monoclonais é possível obter anticorpos específicos para os diferentes determinantes antigénicos que compõem um antígeno complexo e daí a importância que os mesmos têm tido nos últimos anos no estudo dos marcadores das membranas celulares dos diferentes tecidos do organismo e inclusivamente de células tumorais [11,14,16]. Finalmente, a possibilidade de fazer crescer os hibridomas quer em cultura, ou na cavidade peritoneal de animais com a consequente produção de grandes quantidades de anticorpos e de conservarem-se congelados como qualquer outra linhagem celular conferem-lhe um singular valor na Imunologia dos nossos dias.

Com base nos anticorpos monoclonais, vários antígenos superficiais, já foram identificados e classificados como marcadores de diferentes populações e sub-populações celulares. É neste contexto que os linfócitos B, são reconhecidos pela presença do marcador mIg e os linfócitos T por possuírem o marcador CD11 (CD=cluster of differentiation). A identificação dos marcadores, levou a uma profunda compreensão quanto à classificação dos linfócitos T. Segundo "International Leukocyte Differentiation Antigen Workshop" na base dos anti-corpos monoclonais que reagem com os diferentes marcadores, classificou e adoptou a seguinte nomenclatura, para as diferentes sub-populações de linfócitos T: linfócitos T4 "helper/inducer cells" com marcador CD4 associado a função de induzir a proliferação dos linfócitos em geral e ajudar eficazmente as outras células a adquirir a sua imunocompetência e montar uma resposta imune apropriada e linfócitos T8 "T cytotoxic/supressor cells" com o marcador CD8 associado a função de destruir os tecidos infectados e de suprimir a resposta imune sempre que necessário [1,3,8,9,10,12,16,17].

Algumas doenças infecciosas, como o sarampo, a tuberculose e certas doenças parasitárias e nutricionais parecem ter uma certa influência nas concentrações de linfócitos [18] de cada indivíduo. Por exemplo, a malária em situações de endemicidade, pode ser responsável pela diminuição dos linfócitos T, como já foi descrito na Nigéria [5] e no caso de, parasitemia aguda por Plasmodium falciparum, esta pode produzir uma mudança notável no número e percentagem dos linfócitos B e T circulantes [18,19,20,21,22]. Outras doenças endêmicas nos países em desenvolvimento, como o sarampo e a tripanossomíase [8] também levam a diminuição da concentração dos linfócitos com marcador CD4(T4), população de linfócitos T helper/inducer. A tuberculose pulmonar uma doença frequente em Moçambique [23], em estado avançado é acompanhada por um decréscimo persistente do número relativo de células CD4 [8].

Para além de situações de doenças, a raça e os factores genéticos podem contribuir na variação dos valores das concentrações das diferentes populações celulares, como se demonstrou num estudo feito na Africa do Sul [24]. Desse estudo, verificou-se que indianos e negros sul-africanos tinham valores altos de linfócitos B em relação aos brancos sul-africanos, ainda que estes valores possam estar associados a factores sócio-económicos característicos daquele país.

Moçambique não se encontra fora deste contexto, pois nele existem de forma endémica várias doenças infecciosas, e parasitárias bem como factores nutricionais, que justifica a necessidade de estabelecimento dos valores limites dos intervalos de referencia das concentrações dos linfócitos T com fins de aplicação no diagnóstico laboratorial de imunodeficiências de etiologias diversas.

Valores normais para as concentrações destas populações principais, já foram estudados e estabelecidos para as populações

de países desenvolvidos, havendo presentemente poucos estudos comparativos feitos para os países em desenvolvimento [7,18] e não existindo algum para Moçambique. Alguns valores referenciais de subpopulações de linfócitos T, obtidos da UCLA Medical Immunology Laboratory, UCLA School of Medicine los Angeles, Calif. [8] são os seguintes:

CD11 (T11)			CD4 (T4)		CD8 (T8)	
Mediana	%	No./mm ³	%	No./mm ³	%	No./mm ³
	72	1,258	45	756	25	450

A razão entre as células CD4(T4) e CD8(T8) (Th1/Tcs) é de extrema importância, como expressão do estado do sistema imune [8]. Por exemplo, esta razão é importante, para previsão do progresso até ao SIDA em grupos de risco infectados por HIV [22], sendo corroborado por um estudo feito em 40 homens considerados saudáveis, em Nova York nos quais observou-se uma diminuição do valor da da concentração absoluta das células CD4(T4) e uma inversão da razão T4:T8, pouco antes de desenvolverem o SIDA [25]. É assim que em estado "são" a razão T4/T8, está entre 1 a 2 [4,25] chegando por vezes até 3 [24]. Esta razão ganha cada vez mais importância com a descoberta de que a infecção por HIV leva a uma eliminação selectiva dos linfócitos T4 [4,5], com um aumento das células T8 levando a inversão da razão T4/T8 [8], assumindo um valor numericamente igual ou inferior a 0.5 [25], nas populações dos países desenvolvidos onde tem sido estudadas.

As anormalidades numericas da razão T4/T8 não só se resumem à diminuição, pois em algumas situações patológicas, como certas infecções bacterianas, particularmente em endocardites causadas por Staphylococcus aureus ou Klebsiella pneumoniae, podem conduzir a um aumento relativo de células T4 elevando a razão T4/T8 até 20 [8].

Quer os valores normais das concentrações das sub-populações de linfócitos T quer a razão dos linfócitos T4/T8, variam de uma região geográfica a outra, pois os factores de que eles dependem também são diferentes. O gráfico 1, testemunha esta variação, do qual pode se verificar que os europeus tem valores elevados de concentrações (N° de células/ mm^3) de linfócitos T em relação aos Nigerianos. E os Nigerianos entre si, mostram diferenças de valores dependendo da região geográfica em que vivem [18].

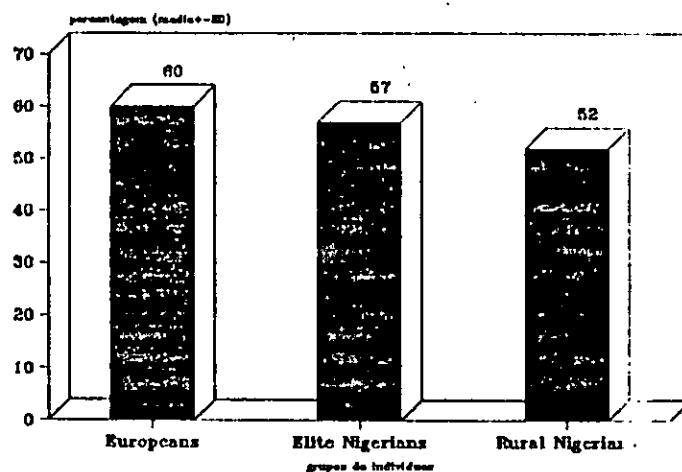


Fig.2 Sub-populações de linfócitos de dois grupos, Nigerianos e Europeus, ambos saudáveis.
O gráfico foi compilado a partir de dados obtidos da referência nº8.

Esta é outra razão que justifica a importância do estabelecimento de valores de referência a nível local, com fins de diagnóstico clínico.

Neste sentido os valores das concentrações e as percentagens dos linfócitos T4 e T8, já há muitos anos, em imunologia clínica, são

usados como um instrumento de apoio para a avaliação do estado imune, perante uma grande variedade de doenças crónicas e agudas nas que existem evidências de alterações do sistema imune [8].

Para além disso, no caso particular de Moçambique, a existência de um número elevado de doentes com manifestações compatíveis com imunodeficiência de várias etiologias, agravada pela presente pandemia de SIDA, o estudo dos valores de referência de sub-populações de linfócitos T, teria duas aplicações principais: (1) na área clínica, como um instrumento que permitiria o seguimento de doentes na avaliação do seu estado imune, e para o prognóstico da evolução de casos de SIDA, e (2), na investigação, poderia ajudar a avaliação de vacinas na sua fase de ensaio no campo [26], permitindo uma melhor avaliação do estado imune daqueles indivíduos vacinados.

Devido à variabilidade dos valores considerados normais dos linfócitos T, e a importância que os mesmos têm nas diversas áreas tornou-se necessário, o desenho deste trabalho com objectivo de determinar os valores de referência para sub-populações de linfócitos T em indivíduos moçambicanos adultos sem manifestações (sintomas) evidentes de doença e porém considerados como "saudáveis" e para a razão entre os linfócitos com marcadores CD4 e CD8 isto é a relação linfócitos T helper/inducer e linfócitos T supressores/citotóxicos.

SEGUNDA PARTE

OBJECTIVOS

1. Determinar os valores limites dos intervalos de referência das concentrações de leucócitos totais, linfócitos totais, subpopulações de linfócitos T11(CD11), T4(CD4) e T8(CD8), com um intervalo de 95% de confiança em indivíduos moçambicanos adultos de ambos os sexos com ausência de sintomas aparentes de doença, para fins de diagnóstico laboratorial.
2. Determinar com um intervalo de confiança de 95%, os valores limites do intervalo de referência da razão entre as concentrações de subpopulações T4(CD4) e T8(CD8) nos referidos indivíduos, para fins de diagnóstico laboratorial

METODOLOGIA DE ESTUDO

1. Amostragem

Foram estudados no total de 80 indivíduos adultos (idade maior ou igual a 15 anos) na proporção de 1:1 para ambos os sexos. As amostras dos indivíduos do sexo masculino foram todas colhidas do Banco de Sangue do H.C.M. a partir de doadores de sangue durante as suas visitas regulares de doação de sangue.

As amostras de sangue do grupo de indivíduos do sexo feminino foram colhidas nos Centros de Saúde da Polana e do Alto-maé, entre as mulheres atendidas na consulta de planeamento familiar. Os centros de saúde foram uma alternativa para fazer face à falta de regularidade de doadores do sexo feminino no Banco de Sangue e foram escolhidos pelas facilidades administrativas que mostraram. As intervenções instrumentais, em relação à colheita de sangue foram

feitas pelo pessoal de saúde em serviço e sempre com prévio consentimento do indivíduo em questão. No caso dos dadores de sangue a amostra para o estudo, foi obtida da única picada no momento da doação, aproveitando o sangue restante no tubo colector (do saco de colheita usado no Banco de Sangue) antes de entrar em contacto com o anti-coagulante, usado de rotina naquele centro hospitalar (Citrato).

Em ambos os casos os indivíduos foram submetidos a um exame clínico para descartar possíveis doenças e lhes foi feito um exame serológico de HIV, e as idades e sexos correspondentes foram registados.

7 ml de sangue venoso, foram colhidas num tubo plástico contendo 1ml de heparina sódica (1000 u.i./ml). As amostras colhidas foram sem demoras levadas ao laboratório de imunologia do I.N.S., a temperatura ambiente, em frascos plásticos de 10 ml, onde foram imediatamente processadas.

Naqueles casos em que, o processamento das amostras tivesse que ser adiado sempre por um tempo máximo de 2 horas, as amostras foram guardadas a uma temperatura de 4°C. Mais do que esse tempo, as amostras eram desconsideradas. Processaram-se em cada dia de trabalho, 3 a 5 amostras (1 amostra= 1 indivíduo).

2. Leucograma [27]

O leucograma é a técnica que permite quantificar os leucócitos no sangue total a partir de uma amostra, quantidade referida em termos de concentração (numero de células por milímetro cúbico). Para tal um volume de 0.05 ml de sangue heparinizado foi diluído em 0.95ml de solução de Turk, com ajuda duma pipeta apropriada segundo recomenda o método. Após 5 a 7 minutos de repouso, ocorre a lise dos eritrócitos, deixando somente os leucócitos que, foram posteriormente contados numa câmara de NEUBAUER melhorada, com profundidade de 1 mm. A contagem foi feita ao microscópio óptico

(Olympus), na objectiva de ampliação de 4x. Número de células contadas em quatro grandes áreas segundo indica o método [28], foram registadas com ajuda de um contador de mão. (Protocolo 1 em anexo I).

3. Contagem diferencial (Fórmula leucocitária) [27]

A contagem diferencial é o procedimento que se conhece como determinação da fórmula leucocitária em muitos laboratórios de análises clínicas. Contar diferencialmente os leucócitos significa que diferentes tipos de leucócitos são contados separadamente. Assim que, da amostra levada ao laboratório, uma gota foi estendida (esfregaço) em lamínas de microscopia, bem limpas (protocolo nº1 em anexos I). O esfregaço era feito de modo que fosse o mais fino possível, para obtenção de uma única camada de células. Os filmes de sangue, foram deixados secar a temperatura ambiente, pelo menos 20 minutos, depois fixados em álcool metílico absoluto, durante poucos segundos. Todas as lamínas foram coradas segundo a técnica de coloração de Romanowsky [28]. Cinco tipos de células foram considerados e contados, segundo o seu tamanho, cor do núcleo e dos granulos citoplasmáticos. Os cinco tipos considerados foram: eusínófilos, basófilos, linfócitos, neutrófilos e monócitos. Contou-se em cada esfregaço, pelo menos 100 células no total e posteriormente calculadas as percentagens de cada tipo. (ver cálculos, nesta secção).

4. Isolamento de linfócitos [28,29]

O método de Boyum, baseado na centrifugação em gradiente de densidade (Histopaque "Sigma Chemicals"), foi usado para a separação de linfócitos. Fez-se uma suspensão de 3 ml de sangue heparinizado, em 5 ml de RPMI 1640 (Roswell) Park Memorial

Institute) com bicarbonato de sódio. Num tubo plástico de 15 ml com fundo não cônico, a mistura, foi colocada cuidadosamente sobre o Histopaque de modo a manter a interfase entre a suspensão celular e a solução de Ficoll/paque. O conjunto foi centrifugado a uma força de 400 x g durante 30 minutos.

Os linfócitos formavam um anel na região da interfase de onde foram transferidos para um tubo limpo, com ajuda de uma pipeta Pasteur ao qual se seguiam três lavagens em RPMI 1640, por centrifugação durante 10 minutos a 200 x g. Foi introduzida uma alteração do protocolo original (protocolo 3 anexo I), após o processamento de um terço das amostras. Finda a lavagem, os linfócitos depositavam-se no fundo do tubo, deixando-as num volume de 20-30µl, ressuspensos para os passos seguintes, em 20µl, conseguindo-se uma suspensão com concentrações celulares compreendidas entre 2×10^6 células/ml e 5×10^7 células/ml..

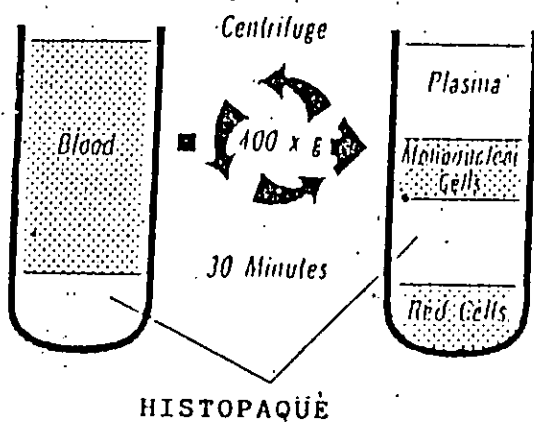


Fig.3 mostra um esquema de separação de linfócitos pelo método de centrifugação de gradiente de densidade em HISTOPAQUE.

Figura extraída do manual da Sigma Chemicals

5. Teste de viabilidade [13]

Durante o processo de separação pode ocorrer mortalidade celular, a que pode, levar a alteração dos marcadores reconhecidos pelos anticorpos monoclonais. Assim todas as amostras com uma viabilidade inferior a 80% foram rejeitadas. A viabilidade (número de linfócitos vivos em percentagem), é determinada por uma contagem

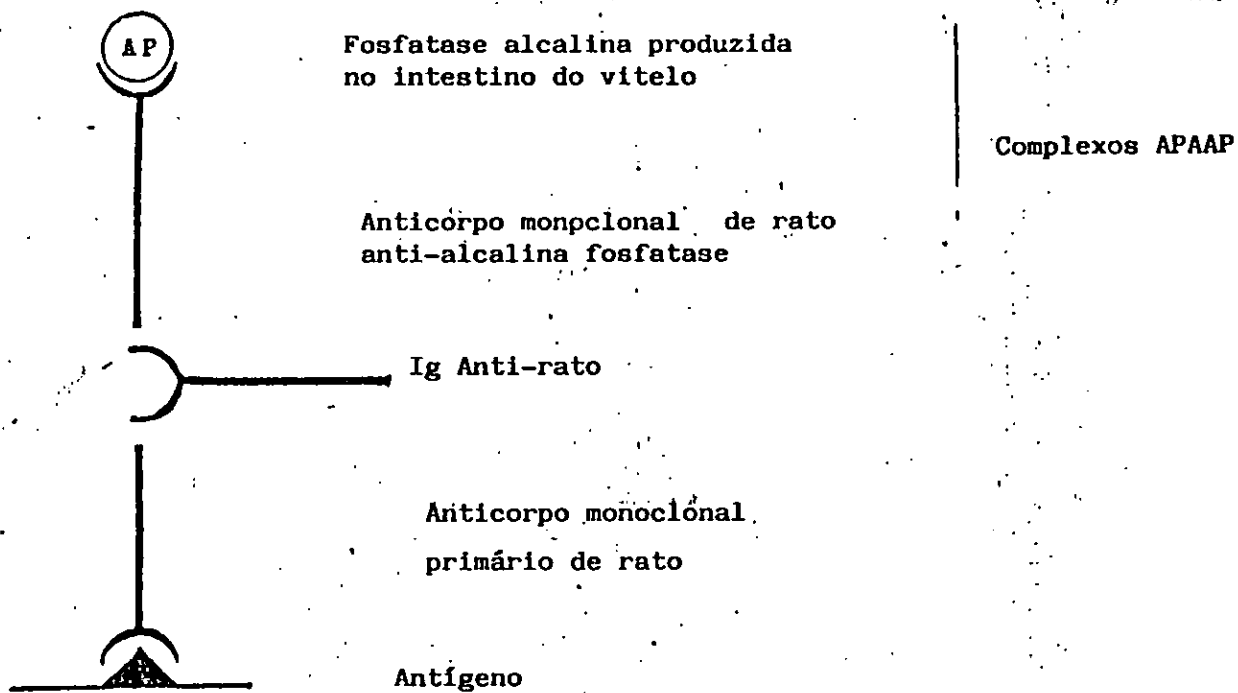
simples, na câmara de NEUBAUER melhorada, sendo eosina usada como corante vital. As células vivas viam-se opacas enquanto que as mortas coravam a vermelho, pela penetração da eosina. Foram contadas todas as células existentes na área recomendada [5], (vivos/mortos), com ajuda dum contador de mão (protocolo 4 em anexos I)

6. Identificação de subpopulações de linfócitos T [12,13,15]

Princípio da técnica

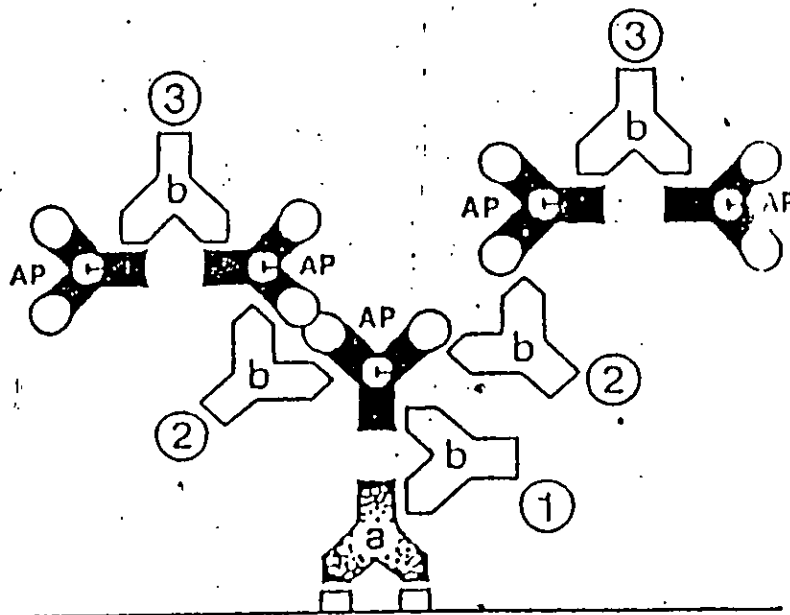
Nome da técnica: APAAP "Alkaline Phosphatase Anti-Alkaline Phosphatase".

Esta técnica é baseada no reconhecimento dos determinantes antigenicos presentes nos marcadores de membrana das diferentes sub-populações de linfócitos T em esfregaços e o posterior revelamento, mediante o uso dum anticorpo monoclonal específico para imunoglobulina de rato que serve de união entre o primeiro anticorpo monoclonal e os complexos imunes solúveis, formados entre a fosfatase alcalina no intestino do vitelo "calf intestinal alkaline phosphatase" e o anticorpo monoclonal para esta enzima. O produto da reacção enzimática é vermelho, sendo o "naphthol AS-MX phosphate" (fosfato de naftol AS-MX) e o "fast Red TR" usados como substrato e cromogénio respectivamente. Com o fim de inibir a actividade da alcalina fosfatasa endógena das células humanas, adiciona-se ao substrato uma substância chamada levamisole. Uma particularidade desta técnica em relação a outras técnicas relacionadas, é o uso do anticorpo monoclonal "anti-rato" (link) que serve de ponte entre o anticorpo monoclonal primário dirigido contra o marcador da membrana e o complexo imune Fosfatasa-Anticorpo Monoclonal Anti-Fosfatasa, como aparece representado no esquema da figura 3.



Apresentação esquemática da técnica de APAAP

DIAGRAMA ESQUEMATICO DA TECNICA APAAP AMPLIFICADA



- a = Anticorpo monoclonal primário
- b = Ig anti-rato
- c = Complexos APAAP
- 1, 2 e 3 = número de ciclos de incubação

Fig. 4 Esquema de funcionamento do sistema APAAP.

Procedimento

Para cada indivíduo estudado, foram preparadas 3 esfregaços em lâminas de microscopia ordinárias, a partir dos linfócitos separados das amostras de sangue periférico segundo protocolo 3 em anexo I.

Cada lâmina foi rotulado cujos dizeres foram: número da amostra, data de processamento, e o nome de monoclonal a ser usado (anti-CD4(T4), anti-CD8(T8) ou anti-CD11(T11)). As lâminas foram deixadas secar a temperatura ambiente (18-25°C) por duas horas. Uma vez as lâminas secas, foram fixadas em acetona-metanol na proporção de 1:1 durante 60 segundos [12]. Logo a seguir aplicaram-se sobre o esfregaço de células 2 gotas (20µl) do anticorpo monoclonal primário correspondente ao fenótipo celular a identificar, deixando incubar a temperatura ambiente e em câmara húmida durante 30 minutos. Aplicaram-se igualmente 2 gotas de link (anticorpo anti-rato), o Complexo APAAP e finalmente o substrato, deixando incubar por 30 minutos os dois primeiros reagentes e 20 minutos para o substrato, em câmara húmida. Entre as mudanças dos diferentes reagentes, as lâminas foram lavadas 3 vezes consecutivamente, em uma solução tampão de TBS (tris buffer solution), durante 5 minutos em cada lavagem.

Todos os reagentes principais utilizados procediam dum KIT que inclui: anti-corpos monoclonais primários (T4, T8 e T11), anti-corpo monoclonal que serve de ponte (ver o princípio da técnica), complexo APAAP, substrato e o tampão para o substrato [12]. A reacção manifesta-se por um precipitado vermelho, na superfície da membrana. Para um melhor contraste, afim de facilitar a leitura ao microscópio óptico na objectiva de 20x, foi aplicada sobre as lâminas a hematoxilina de Mayer durante 5 minutos. Seguida a aplicação da hematoxilina, as lâminas foram mergulhadas 10 vezes

em água amoniaca a 2%, depois lavadas em água corrente durante alguns minutos. Preparações definitivas, em gelatina glicerina a 37°C, foram feitas pouco antes da leitura ao microscópio. As lâminas foram lidas no mesmo dia da sua preparação, embora a leitura pudesse ser adiada por muitos dias, por reconhecer que a reacção se mantém óptima, (quando as lâminas forem guardadas numa temperatura de 4°C), por períodos longos [26]. Todos os reagentes desta secção foram guardados na geleira sob 4°C, com excepção do substrato que segundo recomendações do fabricante foi guardado a -20°C. Com o auxílio do microscópio óptico, em cada lâmina, foram contados num total de pelo menos 500 células, incluindo positivas (aquelas que apresentam um precipitado vermelho ao longo da membrana celular) e negativas (as que não apresentam a característica referida).

7. Reproducibilidade

Foram seleccionadas ao acaso 5 lâminas correspondentes a cada sub-população (CD4(T4), CD8(T8) e CD11(T11)) conforme o anti-corpo monoclonal usado, completando 15 lâminas no total e cada uma lida repetitivamente 3 vezes. Cada leitura foi registada para o cálculo posterior da reproducibilidade.

8. Cálculos

Todos os cálculos não estatísticos, foram feitos no Spreadsheet Lotus 123, de acordo com as fórmulas que abaixo se apresentam, todas as concentrações aqui apresentadas são dadas em no de células por mm³.

a) Concentração de leucócitos no sangue total

$$\text{No. de leucócitos/mm}^3 \text{ (NL)} = \frac{\text{lc} \times \text{d}}{0.4}$$

com: lc- o número de leucocitos contados na câmara

d- a diluição do sangue na solução de turk

0.4=volume da câmara. área=1 mm², área total=4mm²
profundidade=0.1mm; volume=4 x 0.1=0.4 mm³

b) Percentagem de polimorfonucleares

$$\text{Percentagem de polimorfonucleares (PM)} = \frac{\text{tl} \times 100}{\text{sl}}$$

com: tl-número de leucócitos de um dado tipo de leucócitos.

sl-somatório de todos os tipos de leucócitos contados.

c) Concentração absoluta dos diferentes tipos de leucócitos (CADL) no sangue total.

$$\text{CADL} = \frac{\text{NL} \times \text{PM}}{100}$$

d) Viabilidade de linfócitos (VL)

$$\text{VL} = \frac{\text{Nv}}{\text{Nv} + \text{Nm}}$$

com: Nv-número de linfócitos vivos

Nm-número de linfócitos mortos

e) Porcentagem de linfócitos T totais (PLT)

$$PLT = \frac{T11}{tc} \times 100$$

com: T11-valor numerico dos linfócitos T11 contados
tc-total de células contadas

f) Concentração de linfócitos T totais/mm³ (CLTS)

$$CLTS = \frac{CADL \times PLT}{100}$$

g) Porcentagem das diferentes subpopulações de linfócitos T "T4 e T8" (PSL)

$$PSL = \frac{T_p \times 100}{T_p + T_n}$$

com: T_p-número de um tipo de linfócitos T tidos como positivos.
T_n-número de linfócitos tidos como negativos.

h) Concentração de diferentes subpopulações de linfócitos T no sangue total em mm³ (CSLT)

$$CSLT = \frac{CLTS \times PSL}{100}$$

i) Razão entre T4 e T8 (CD4/CD8)

$$CD4/CD8 = \frac{T4}{T8}$$

com: T4-valor absoluto de linfócitos T4 (CSLT).
T8-valor absoluto de linfócitos T8 (CSLT).

Limitação

A limitação principal deste trabalho estava relacionada com a definição de indivíduos "saudáveis", pois este conceito é bastante controverso tendo diferentes interpretações de região para região. Por exemplo, em muitas sociedades africanas um indivíduo, pode sofrer de malária, malnutrições não aparentes e ser considerado são, e em outras não. Este problema foi solucionado, assumindo que um indivíduo saudável é aquele que não apresenta sinais e nem sintomas aparentes de doença.

ANALISE ESTATISTICA

Os resultados obtidos para cada uma das variáveis estudadas foram analisados estatisticamente para o cálculo do intervalo de confiança de 95% (Média \pm 2SD) e da possível significação estatística das diferenças observadas tendo em conta ao sexo e a idade. Os dados incluídos nos cálculos para a produção dos presentes resultados, foram todos aqueles que se encontraram dentro do intervalo [Média \pm SD]. Os dados que calhassem fora do mesmo intervalo, foram imediatamente excluídos dos cálculos consequentes.

As variáveis objecto de estudo e para as quais foram calculados os valores médios e os intervalos de confiança a 95% foram:

- Linfocitos com marcadores CD4
- Linfocitos com marcadores CD8
- Linfocitos com marcadores CD11
- Razão CD4/CD8
- Leucocitos totais
- Linfocitos totais

Para cada uma das variáveis acima discriminadas, avaliou-se se as mesmas seguiam uma distribuição normal que permitiria utilizar a média e desvio padrão como forma de calcular os limites dos intervalos de referência. Esta análise foi feita separadamente para o sexo Masculino e o sexo Femenino, utilizando um teste de Chi quadrado para a qualidade de ajuste a uma distribuição normalidade, segundo o pacote de aplicações estatística MICROSTAT.

As comparações dos valores obtidos para as diferentes populações celulares estudadas bem como para a razão CD4/CD8 entre os dois sexos foram realizadas utilizando o teste t de student aceitando

como significativa toda diferença cujo valor de probabilidade p fosse menor que 0.05, segundo o pacote de aplicações estatística para microcomputador MICROSTAT.

O possível efeito da idade sobre os valores obtidos nas diferentes populações celulares avaliou-se mediante a análise estratificada dentro de cada sexo para os grupos etários de 15-24 anos; de 25-35 anos e maiores de 35 anos; e comparando os resultados obtidos em cada sexo dentro do mesmo grupo etário. Todas estas comparações foram feitas utilizando o teste t de student segundo o pacote de aplicações estatística para microcomputador MICROSTAT, e aceitando como significativa toda diferença cujo p fosse menor que 0.05.

Para além dos procedimentos anteriores que permitiriam a estimação dos valores limites dos intervalos de referência com 95% de confiança, dos valores obtidos assim como avaliar o efeito do sexo e a idade sobre os mesmos; procedeu-se ao cálculo da mediana e dos desvios percentuais, sem observância do sexo, para poder comparar com resultados obtidos em outros estudos da mesma natureza. Neste contexto, a mediana e os respectivos desvios percentuais calculadas foram referentes às concentrações e as percentagens das variáveis estudadas.

Por último para avaliar a reproductibilidade nas contagens dos linfocitos CD4, CD8 e CD11, a partir dos resultados obtidos nas lâminas lidas três vezes e às cegas, calculou-se a taxa de reproductibilidade das contagem de cada uma de estas subpopulações de linfocitárias.

TERCEIRA PARTE

RESULTADOS

Nos indivíduos estudados, após a exclusão daqueles cujos valores das concentrações celulares encontraram-se fora do intervalo de confiança [Média \pm 2SD], resultou que dos 80 indivíduos estudados, 34 masculinos e 36 femininos foram considerados no cálculo dos valores de referência (ver os mapas em anexos II) e cujos valores mínimos e máximos dos diferentes grupos celulares que compõem a população de células brancas do sangue são apresentados segundo o sexo, na tabela I.

Tabela I

Valores mínimos e máximos de diferentes grupos de 1 eucócitos do sangue, agrupados segundo o sexo.

TIPO DE CELULAS	SEXO MASCULINO N=34		SEXO FEMININO N=36	
	MINIMO	MAXIMO	MINIMO	MAXIMO
NEUTROFILOS	262	8935	760	6601
BASOFILOS	0	1.165	0	846
EUSINOFILOS	0	4446	0	769
MONOCITOS	0	882	0	4972
LINFOCITOS	695	7612	1004	14684

N-º de indivíduos incluídos no cálculo

No que respeita aos valores máximos e mínimos observados para as subpopulações de linfócitos segundo a presença dos marcadores CD4, CD8, CD11 e a razão CD4/CD8 estes aparecem discriminados segundo o sexo na tabela II.

Tabela II

Valores mínimos e máximos de sub-populações de linfócitos T e razão CD4/CD8

SUB-POPULAC. T	SEXO MASCULINO N=34		SEXO FEMININO N=36	
	MINIMO	MAXIMO	MINIMO	MAXIMO
CD11 (T11)	142	1829	541	2341
CD4 (T4)	112	842	113	892
CD8 (T8)	64	406	89	512
CD4 (T4) / CD8 (T8)	1.1	3.7	0.7	2.6

N-º de indivíduos incluídos no estudo

A partir dos resultados obtidos nos indivíduos estudados, estimaram-se os intervalos de confiança de 95% para os valores de referência dos diferentes grupos celulares que compõem a população das células brancas do sangue e em particular das subpopulações de linfócitos com marcadores CD11 (subpopulação de linfócitos T); CD4 (subpopulação de linfócitos T4 helper/inducer); CD8 (subpopulação de linfócitos T8 supressor/cytotoxic) e para a razão CD4/CD8 os quais resumem-se na tabela III. Foram utilizados para esta estimativa os valores médios e os desvios-padrão pois a distribuição dos valores observados (Figuras 4,5,6,7,8e 9 em anos II) aproximavam-se a distribuição normal segundo o teste de Chi quadrado para a qualidade de ajuste a uma distribuição normal, feito em cada variável estudada (para mais detalhes ver anexo II).

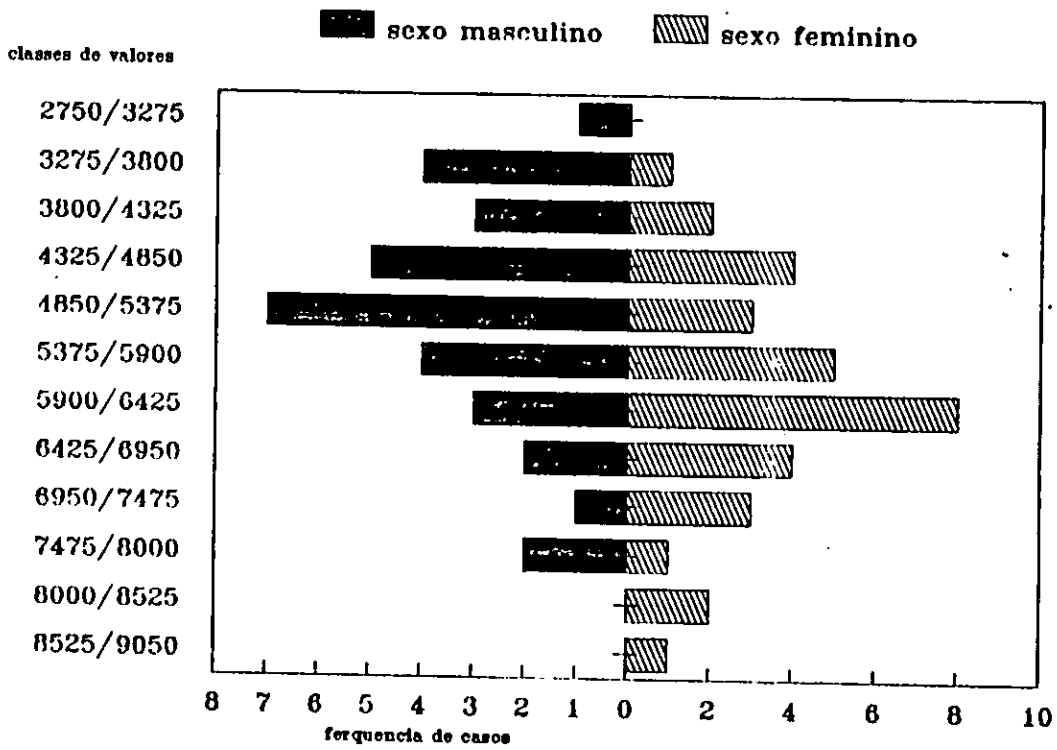


Fig. 5 Histograma referente aos valores de concentração de leucócitos totais.

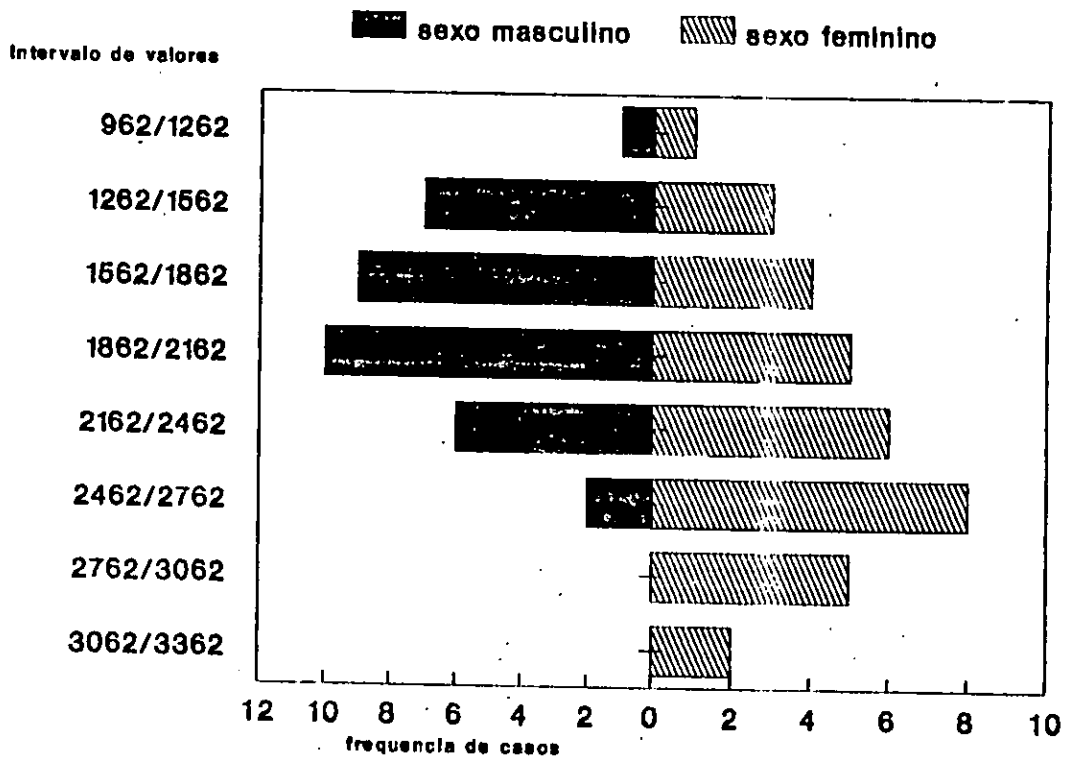


Fig. 6 Histograma referente aos valores de concentração de linfócitos totais.

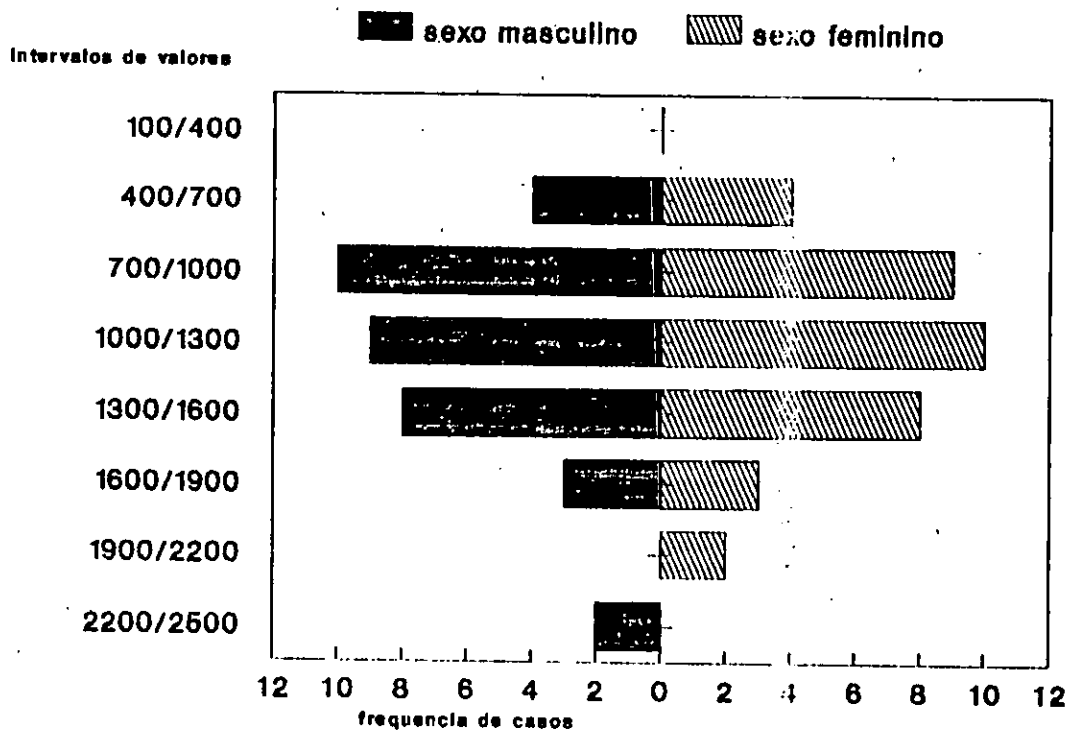


Fig.7 Histograma referente aos valores de concentração de linfócitos com marcador CD11.

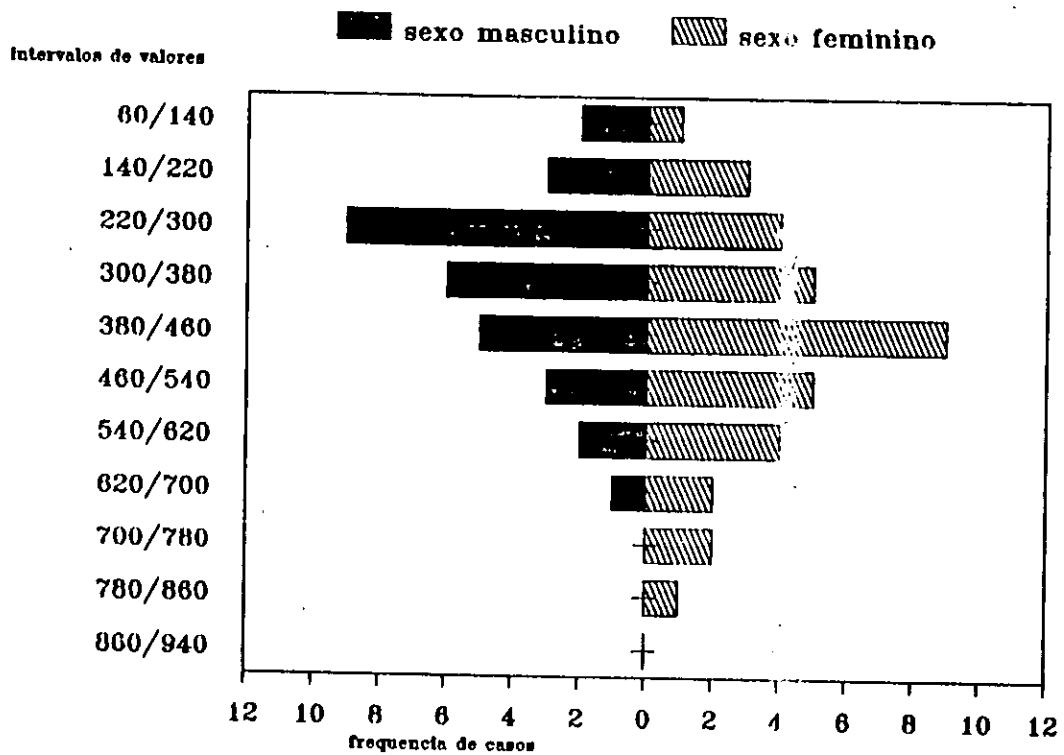


Fig.8 Histograma referente aos valores de concentração dos linfócitos com marcador CD4.

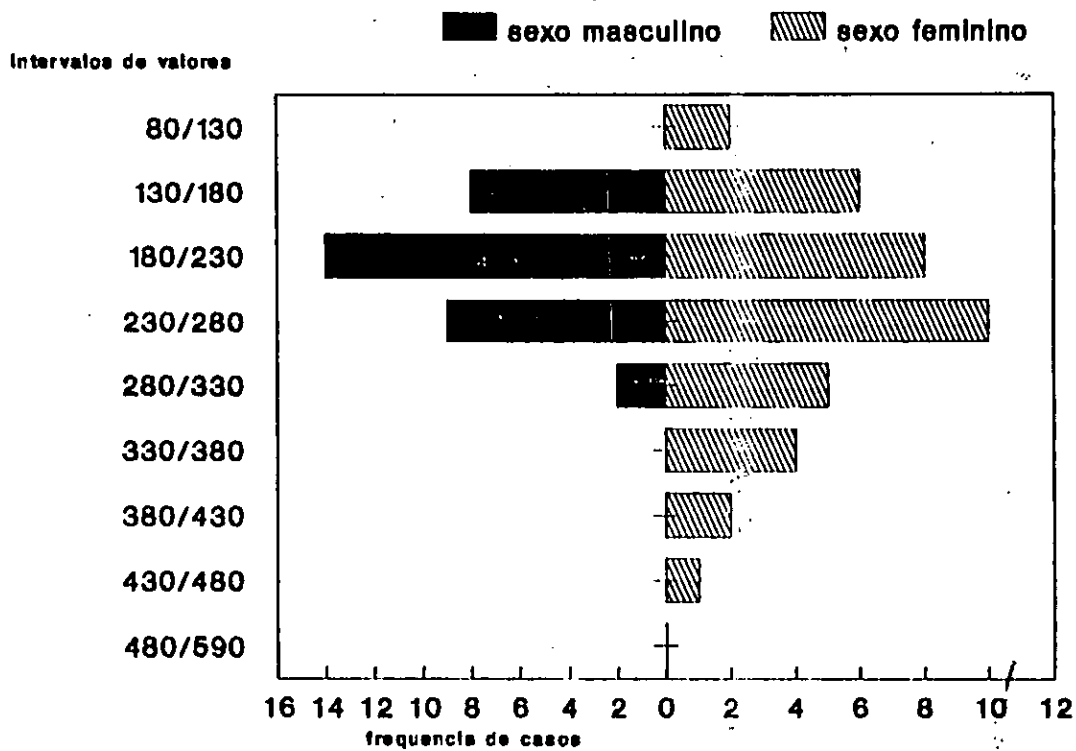


Fig.9 Histograma referente aos valores de concentração de linfócitos com marcador CD8.

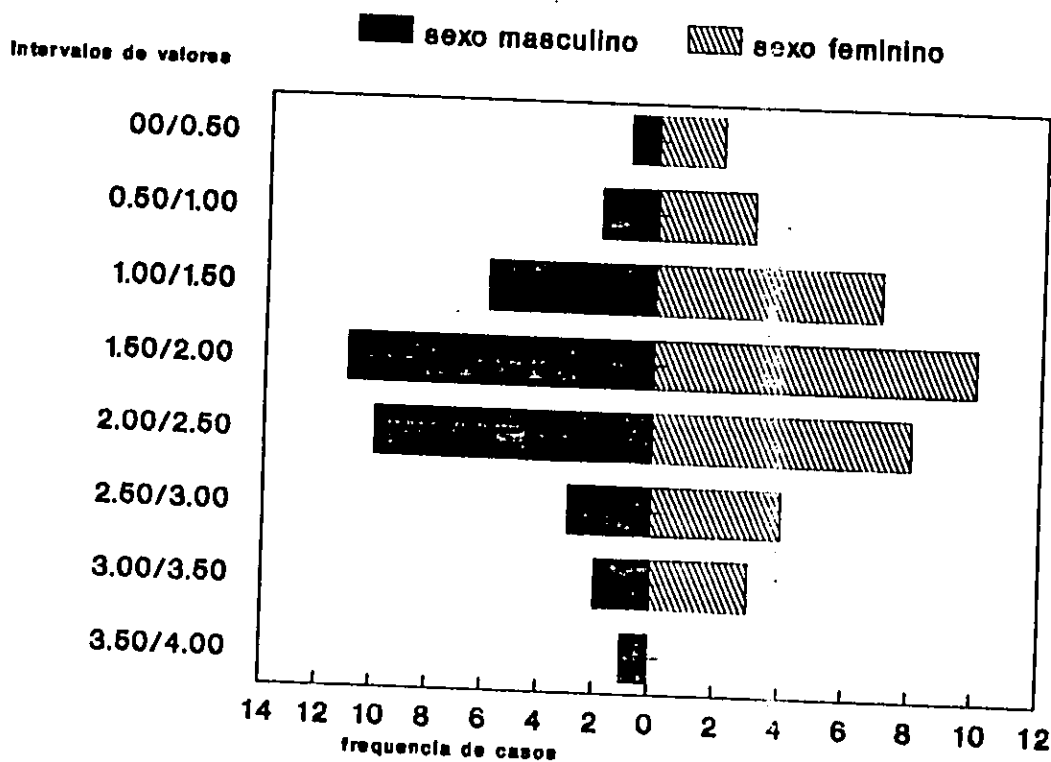


Fig.10 Histograma referente aos valores da razão entre os linfócitos com marcadores CD4 e CD8.

Tabela III

Média e limites de intervalos de referência calculados com 95% de confiança, de das concentrações das populações celulares estudadas.

	indivíduos do sexo masculino			indivíduos do sexo feminino		
	lim. inf.	média	lim. sup.	lim. inf.	média	lim. sup.
linf. tot.	1754	4688	7622	2166	5956	9746
linf. CD4	19	371	761	55	381	707
linf. CD8	15	187	359	39	229	419
linf. CD11	68	966	1864	781	1212	2074
CD4/CD8	0.88	1.96	3.04	0.79	1.71	2.63
linf. tot.	587	4885	4357	2675	2679	8029

lim. inf. = limite inferior = média - 2 x SD

lim. sup. = limite superior = média + 2 x SD

Os valores estimados para 95% de intervalo de confiança, segundo o sexo mostaram diferenças que submetidas ao teste de significação estatística do teste 't' de Student apresentaram os resultados que aparecem resumidos na tabela IV.

Tabela IV

COMPARAÇÃO DOS VALORES MÉDIOS DAS DAS CONCENTRAÇÕES DAS DIFERENTES SUB-POPULAÇÕES CELULARES ENTRE OS GRUPOS DOS INDIVÍDUOS DO SEXO MASCULINO E FEMININO.

SUB-POPUL.C.	MEDIA DOS MASCULINOS	MEDIA DOS FEMININOS	t	D.F.	p
LEUC_TOT	4688	5956	3.1176	68	1.336E-03 **
LINF_TOT	1885	2679	1.5778	68	0.0242 **
CD4	371	381	0.2483	68	0.0494 **
CD8	187	229	1.9347	68	0.4023 *
CD11	966	1212	2.3395	68	0.0286 **
CD4/CD8	1.96	1.71	2.0094	68	0.0111 **

* p > 0.05 médias comparadas não diferem significativamente.

** P < 0.05 médias comparadas diferem significativamente.

Os resultados da comparação dos valores obtidos para as variáveis estudadas tendo em conta a idade e o sexo para avaliar a possível influência da variável idade nos valores das variáveis estudadas resumem-se nas tabelas de V até XV. Nas mesmas destaca-se a não existência de diferenças significativas dentro do sexo masculino quando comparados os diferentes etários (M1= masculino idade 15-24 anos; M2= Masculino idade 25-34 anos; M3= Masculino maior que 35 anos de idade), no entanto observaram-se diferenças significativas dentro do sexo feminino, entre os valores observados para os linfócitos totais

e subpopulações de linfócitos com marcadores CD4, CD8 e CD11 dentre os grupos de idade de 15-24 anos e 25-34 anos, correspondendo a F1 e F2 respectivamente.

COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DAS DIFERENTES CLASSES DE IDADE EM DIFERENTES POPULAÇÕES CELULARES.

a) indivíduos do sexo masculino

TABELA V LEUCOCITOS TOTAIS

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
M1 COM M2	4683	4656	-0.369	21	0.4855 *
M1 COM M3	4683	4740	0.0726	15	0.4715 *
M2 COM M3	4655	4740	-0.1552	26	0.4400 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas entre as médias comparadas.

TABELA VI LINFOCITOS CD4

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
M1 COM M2	367	347	0.2033	21	0.4204 *
M1 COM M3	390	347	0.3552	15	0.3637 *
M2 COM M3	366	390	-0.3373	26	0.3693 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas entre as médias comparadas

TABELA VII VALORES DE LINFOCITOS CD8

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
M1 COM M2	185	166	0.4878	21	0.3154 *
M1 COM M3	201	166	0.7201	15	0.2413 *
M2 COM M3	185	201	-0.4626	26	0.3238 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas entre as médias comparadas

TABELA VIII LINFOCITOS CD11

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
M1 COM M2	945	958	-0.0661	21	0.4740 *
M1 COM M3	1001	958	0.1535	15	0.4400 *
M2 COM M3	945	1001	-0.3271	26	0.3731 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas entre as médias comparadas

TABELA IX RAZÃO CD4/CD8

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
M1 COM M2	2.008	1.936	0.2554	21	0.4004 *
M1 COM M3	1.898	1.936	-0.1388	15	0.4457 *
M2 COM M3	2.008	1.898	0.547	26	0.2945 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas entre as médias comparadas

TABELA X LINFOCITOS TOTAIS

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
M1 COM M2	1933	1844	0.1281	21	0.4496 *
M1 COM M3	1832	1844	-0.0294	15	0.4885 *
M2 COM M3	1933	1832	0.1973	26	0.4226 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas entre as médias comparadas

b) Indivíduos do sexo feminino

TABELA XI LEUCOCITOS TOTAIS

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
F1 COM F2	5700	6258	-0.369	21	0.1871 *
F1 COM F3	2700	4925	0.7530	16	0.2312 *
F2 COM F3	6300	4925	0.8216	18	0.2110 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas entre as médias comparadas

TABELA XII LINFOCITOS CD4

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
F1 COM F2	324	442	2.2243	32	0.0167**
F1 COM F3	324	291	0.3230	16	0.3754*
F2 COM F3	442	291	1.1632	18	0.1300*

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

** $p < 0.05$ diferenças significativas

TABELA XIII VALORES DE LINFOCITOS CD8

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
F1 COM F2	195	264	2.2130	32	0.0171**
F1 COM F3	195	182	0.2375	16	0.4077*
F2 COM F3	264	182	1.0379	18	0.1565*

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

** $p < 0.05$ existem diferenças significativas

TABELA XIV VALORES DE LINFOCITOS CD11

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
F1 COM F2	1061	1365	2.1644	32	0.0190**
F1 COM F3	1061	1042	0.0778	16	0.4695*
F2 COM F3	1365	1042	0.8763	18	0.1962*

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

** $p < 0.05$ existem diferenças significativas

TABELA XV VALORES DA RAZÃO CD4/CD8

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
F1 COM F2	1.652	1.790	0.8286	32	0.2067 *
F1 COM F3	1.652	1.587	0.2550	16	0.4010 *
F2 COM F3	1.790	1.587	0.4858	18	0.3165 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

** $p < 0.05$ existem diferenças significativas

TABELA XVI LINFOCITOS TOTAIS

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	t	D.F	p
F1 COM F2	1855	3496	1.7965	32	0.0409**
F1 COM F3	1855	1916	-0.1624	16	0.4365*
F2 COM F3	3496	1916	-0.1624	18	0.2774*

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

** $p < 0.05$ existem diferenças significativas

No que respeita a comparação entre os mesmos grupos etários, tendo em conta o sexo, os resultados aparecem discriminados nas tabelas de XVII até XXII. Nelas pode apreciar-se a existência de diferenças significativas para as variáveis: leucocitos totais, linfocitos com marcador CD8 e linfocitos com marcador CD11 para o grupo de idade de 25-34 anos, onde os valores médios observados no sexo feminino foram significativamente maiores que no sexo masculino. Tal diferença determinou a apresentação dos resultados segundo o sexo dos indivíduos, tomando em conta a possível influência que este teria nos valores de referência das variáveis em estudo.

TABELA XVII VALORES DE LEUCOCITOS TOTAIS

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	T	D.F.	PROB.
M1 COM F1	4683	5700	1.3880	20	0.0902 *
M2 COM F2	4655	6300	2.4996	33	8.791E-03 **
M3 COM F3	4925	1525	0.1525	26	0.4310 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

** $p < 0.05$ existem diferenças significativas

TABELA XVIII VALORES DE LINFOCITOS CD4

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	T	D.F.	PROB.
M1 COM F1	347	324	-0.2745	20	0.3933 *
M2 COM F2	366	442	1.3439	33	0.0941 *
M3 COM F3	390	291	0.6100	11	0.2771 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

TABELA XIX VALORES DE LINFOCITOS CD8

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	T	D.F.	PROB.
M1 COM F1	166	195	0.8268	20	0.2091 *
M2 COM F2	185	264	2.4794	33	9.221E-03**
M3 COM F3	201	182	0.2389	11	0.4078 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

** $P < 0.05$ existem diferenças significativas

TABELA XX VALORES DE LINFOCITOS CD11

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	T	D.F.	PROB.
M1 COM F1	958	1061	0.5703	20	0.2874 *
M2 COM F2	945	1365	2.8839	33	3.433E-03**
M3 COM F3	1001	1042	-0.0972	11	0.4622 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

** $P < 0.05$ existem diferenças significativas

TABELA XXI RAZAO ENTRE OS LINFOCITOS CD4 E CD8 (CD4/CD8)

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	T	D.F.	PROB.
M1 COM F1	1.936	1.652	-0.2845	20	0.1068 *
M2 COM F2	2.008	1.790	-0.1289	33	0.1335 *
M3 COM F3	1.898	1.587	0.9592	11	0.1790 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

TABELA XXII VALORES DE LINFOCITOS TOTAIS

COMPARACOES	MEDIA 1	MEDIA 2	T	D.F.	PROB.
M1 COM F1	1844	1855	0.0350	20	0.4862 *
M2 COM F2	1933	3496	1.6371	33	0.0556
M3 COM F3	1832	1916	-0.1489	11	0.4422 *

* $p > 0.05$ sem diferenças significativas

A reproductibilidade da contagem das subpopulações de linfócitos T tendo em conta o método utilizado apresenta-se na tabela XXIII.

TABELA XXIII *Reproductibilidade*

	Linfócitos CD4	Linfócitos CD8	Linfócitos CD11
REPRODUCTIBILIDADE	92.4%	95%	98.3%

Dificuldades encaradas

Atendendo a importância deste trabalho para a padronização da técnica usada, achamos importante passarmos a descrever algumas dificuldades encontradas durante a execução da mesma e as respectivas soluções adoptadas. Foi frequente a contaminação por bactérias, das células, na câmara de Neubauer e nos esfregaços de linfócitos, durante a contagem de leucócitos totais e secagem ao ar livre dos esfregaços, que de certo modo só tornava as leituras incofortáveis, sem algum significado nos números de células obtidos [16]. Esta contaminação foi reduzida, para o primeiro caso, fazendo passando por álcool etílico [26] caso, secando os esfregaços de linfócitos rapidamente na incubadora a 37°C. A falta de aderência das células ao vidro (lâminas microscópicas), foi um problema iminente ao longo do trabalho, embora soluções como o uso de lâminas impregnadas com Poly-L-lisina [26], podessem ser adoptadas, mas que não foi possível obtê-las. Porém este problema foi parcialmente resolvido, confinando as células numa pequena área da lâmina, cerca de 314 milímetros quadrados e fixadas durante 90 segundos.

Os anti-corpos monoclonais pareceram pouco sensíveis, o que as vezes levasse a incertezas sobre a positividade ou não de uma célula para um dado monoclonal. Esta fraca sensibilidade, foi constatada, nos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8. A Dako Laboratories (companhia fornecedora) prevê este problema, razão pela qual recomenda a repetição da aplicação do "LINK" e do "COMPLEXO APAAP", para aumentar a intensidade da reacção, uma solução que para nós não era viável dado a limitação da quantidade dos reagentes que possuíamos. Sendo assim, tentamos resolver esta questão, expondo as células ao substrato, por mais dez minutos do tempo recomendado pelo fabricante.

Uma concentração elevada de células, na suspensão de partida para preparação do esfregaço, dificultava grandemente a

orientação dentro do campo microscópico, isto é corria-se o risco de contar algumas células duas ou mais vezes, em outros casos até saltar algumas células por falta de pontos de referência. Este problema foi prontamente resolvido, colocando uma espécie de rede dentro de uma das oculares microscópicas, de modo que esta fosse reflectida sobre o campo. Assim, podia facilmente, encontrar-se pontos de referencia pois as células encontravam-se localizadas dentro dos vários quadradinhos.

DISCUSSÃO

Os valores de referencia estimados para os leucocitos totais nos individuos estudados no presente trabalho, entre 1754 e 7622 leucocitos / milimetro cubico pertencentes ao sexo masculino e entre 2166 e 9746 leucocitos/ milimetro cubico nos individuos do sexo feminino são inferiores aos que tem sido publicados pela OMS para Africa que são entre 4000 e 10000 leucocitos/milimetro cubico sem tomar em conta o sexo do individuo estudado [27]. A diferença é mais marcada nos individuos do sexo masculino que no caso dos individuos do sexo femenino, mais não foi possível aplicar um teste de significação estatística por carecer de dados suficientes a fonte de onde foram extraídos os valores de referencia da OMS.

Da mesma maneira, os valores de referência obtidos para as subpopulações de linfocitos T nos individuos estudados resultaram também inferiores aos descritos por outros autores para outras populações africanas e europeias como pode ser apreciado no sumario apresentado na tabela XXIV.

Tabela XXIV

Valores médios e respectivos desvios-padrão de concentração absoluta (n° de células/ mm^3) e percentuais de subpopulações de linfócitos T e razão dos linfócitos das mesmas subpopulações, em indivíduos moçambicanos, franceses e zimbabueanos saudáveis.

Moç. (n=70)	Média SD	T11 (CD11)		T4 (CD4)		T8 (CD8)		CD4/CD8	
		Média	SD	Média	SD	Média	SD	Média	SD
a) França (n=61)	Média SD	1092.7 459	<61 <11.8	376.5 178.6	<34 <9.5	208.7 92.7	<18 <5.4	1.8 0.5	
b) Zimba- bwe. (n=48)	Média SD	1445.3 685.2	<70.9 <6.5	807.0 377.8	<40.8 <5.3	522.9 342.2	<24.1 <4.6	1.75 0.49	
	Média SD		c)	1040 534	c)		c)		c)

a) Dados extraídos da referência nº32

b) Dados extraídos da referência nº33.

c) Dados omissos, pois a fonte não os apresentava.

Os valores que se encontram foram dos sinais < > são referidos em termos de concentração, sendo nº de células/ mm^3 enquanto aqueles colocados dentro dos mesmos sinais são referidos em percentagem.

O estudo da distribuição de frequência das concentrações das diferentes populações celulares estudadas, com vista a saber se estas se aproximavam a distribuição normal, mediante o teste de Chi quadrado para o ajuste de uma distribuição normal, revelou que a hipótese de que os valores das populações estudadas com as médias e desvios-padrão considerados, estavam normalmente distribuídos, não podia ser rejeitada. Isto permitiu usar a média e o desvio padrão para a determinação dos intervalos de confiança de 95%, para os valores de referência. No entanto, para permitir a comparação com os valores de referência obtidos em estudos realizados noutras populações, estimaram-se também a partir dos resultados obtidos no presente trabalho a mediana e os desvios percentuais (5 e 95 percentilos) para os valores de referência das concentrações e das percentagens, e que como aparece na tabela Tabela XXV resultaram inferiores aos descritos para outros autores.

Tabela XXV

Valores medianos e respectivos percentilos (5 e 95) de concentração absoluta (nº de células/mm³) e percentual de subpopulações de linfócitos T e razão dos linfócitos das mesmas subpopulações, de indivíduos saudáveis, moçambicanos, e Americanos.

		T11 (CD11)	T4 (CD4)	T8 (CD8)	CD4/CD8
Moç. n=70	mediana	1069<60.5>	349<34.5>	208<18.5>	1.75
	perc. 5	503<36>	135<18.5>	82.5<5.8>	
	perc. 95	1848<86>	719<56>	379<32.5>	
a) USA	mediana	1250<72>	756<45>	450<25>	1.73
a)	perc. 5	558<59>	350<31>	147<0.84>	0.84
b)	perc. 95	1948<38>	1334<38>	812<38>	3.05

a) Valores extraídos da referência nº32

b) Valores extraídos da referência nº8

perc.=percentilo

Os valores que se encontram foram dos sinais < > são referidos em termos de concentração, sendo nº de células/mm³ enquanto aqueles colocados dentro dos mesmos sinais são referidos em percentagem.

Esta diferença observada, confirma o exposto, referente a existencia de variações geograficas para os valores de referencia das diferentes populações celulares que intervem na resposta imune. Factores ambientais e diferenças das áreas geográficas, podem ser a causa dessa variação. Porém, a planificação deste trabalho não incluiu o estudo das possíveis factores que podessem afectar os ditos valores, pelo que um esclarecimento das causas dos baixos valores de referencia obtidos nos grupos estudado em Mocambique, em relação aos dos outros países requer um estudo mais aprofundado.

Porém procedeu-se a análise da possível influência da idade e do sexo sobre os valores obtidos para cada uma das populações celulares estudadas. Esta análise demonstrou a existencia de diferenças significativas entre os valores medios das diferentes populações celulares estudadas entre o sexo masculino e o sexo feminino, sendo sempre mais elevadas neste último grupo. Os resultados deste trabalho, sugerem que os dois grupos segundo o sexo, não são homogêneos, o que determinou a apresentação separada dos valores obtidos segundo o sexo dos indivíduos estudados. Em trabalhos da mesma natureza, outros autores não tem constatado esta associação pelo que os valores de referencia estabelecidos para adultos maiores de 15 anos são válidos para ambos os sexos [8,27].

O presente estudo mostrou-se, também limitado para explicar as causas desta diferença, pelo que seria bastante interessante, que futuras pesquisas, estudassem com profundidade as possíveis causas da mesma. Tais trabalhos, deveriam incluir para além dos factores acima indicadas como relacionadas com as variações das concentrações das populações celulares, outros prováveis factores que possam estar na origem das variações das concentrações celulares.

O possível efeito que a idade, dentro dos grupos etários estudados, quer dentro dum mesmo sexo, quer em sexos diferentes, podesse ter sobre os valores de referencia, também foi analisado. Desta análise só encontraram-se diferenças significativas para os valores medios dos linfocitos T11 (CD11); linfocitos T4 (CD4); linfocitos T8 (CD8) e linfocitos totais entre os grupos etários de 15-24 anos e de 25-34 anos do sexo femenino sendo maior os valores medios no último grupo de idade. Dentro dos individuos estudados do sexo masculino, não se constatarem diferenças estatisticamente significativas em relação a idade. A observação destas diferenças significativas no grupo do sexo femenino poderia ser considerada como uma falácia estatistica devido a distribuição dos individuos estudados dentro dos diferentes grupos de idade, tendo em conta o tamanho da amostra estudada. Por outro lado, a inclusão ao acaso dentro deste grupo de idades de individuos com alguma característica particular que não foi controlada e provavel existência de algum factor nas mulheres desse grupo de idade, que afecte os valores das populações linfocitarias fazendo estes mais elevados que nos outros grupos de idades considerados, poderão ser considerados como algumas das causas das diferenças, aqui estatisticamente constatadas. Porém, os resultados deste trabalho não permitem adiantar conclusões sobre estes aspectos, mais eles devem ser tomados em conta, no desenho de futuros estudos neste campo.

Resultados da comparação dos três grupos etários semelhantes nos dois sexos, revelaram diferenças significativas segundo teste t student, ($p < 0.05$), somente nos grupos etários de 15-24 anos, para as concentrações de leucócitos totais, linfócitos com marcador CD4 e CD8. Esta diferença, contribui de certo modo para consistência da constatação anterior, de que os dois grupos estudados (grupo do sexo masculino e do sexo femenino), não podem ser considerados como homogénios.

Outro aspecto a destacar, é o facto de alguns pesquisadores de países desenvolvidos referirem que, a quantificação das subpopulações de Linfócitos T utilizando o metodo de leitura visual, ao microscopio optico, não resulta preciso, recomendando que a quantificação seja feita, mediante uma técnica que requer equipamento bastante caro, chamado "cell sorter ou facs-scan" [31]. Por causa da prevista imprecisão, fez-se o controle da contagem microscópica das subpopulações de linfocitos T (através do cálculo da taxa de reproductibilidade), cujos os resultados, revelaram um alto grau de reproductibilidade dos resultados obtidos, todos eles maiores que 90% e que consideramos esta relacionada com a sensibilidade demonstrada pelos anticorpos monoclonais primarios utilizados. Assim, o anticorpo monoclonal primario que mostrou uma menor sensibilidade, durante a execução da tecnica, cujo o procedimento a respeito deste anticorpo, mereceu algumas modificações, descritas nos resultados, foi o monoclonal ant-CD4 correspondendo a reproductibilidade mais baixa de 92,4% enquanto que o monoclonal especifico para CD11, apresentou a maior reproductibilidade sendo de 98.3%. Por outro lado, as modificações introduzidas na técnica com vista a torná-la eficiente, foram satisfactorias permitindo a padronização da mesma nas condições do nosso pais com uma adequada razão custo/eficacia.

Por último achamos conveniente fazer algumas considerações sobre a importância que os resultados obtidos neste estudo possam vir a ter sobre a aplicação clinica da quantificação das subpopulações de linfocitos T. Como foi descrito na secção de revisão bibliografica, os valores da concentração absoluta dos linfocitos T4 e T8 tem importância na avaliação clinica de individuos com doenças que afectam o sistema imune e em particular com o Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA).

Comparando os valores obtidos em indivíduos mocambicanos considerados neste estudo, sem manifestações aparentes de doença, isto é considerados como "saudáveis", com os publicados por outros autores, para outros países, torna-se necessário uma avaliação da validade dos valores limites indicados por estes últimos, nas condições reais do nosso país. Por exemplo, no caso da infecção pelo HIV o valor limite superior para a concentração de linfócitos T4 a partir do qual se considera que o indivíduo já tem uma imunodeficiência, é de 400 células/mm³, no caso dos indivíduos da Europa e América [31,32]. No nosso caso, seria preciso estudar indivíduos infectados pelo HIV em diferentes estádios da infecção e avaliar se apesar das diferenças observadas na concentração dos linfócitos T4 nos indivíduos saudáveis, este valor limite tem também validade entre os doentes mocambicanos infectados pelo HIV.

Devido as diferenças observadas em relação aos valores de referência das concentrações para as subpopulações celulares, comparadas com os dos outros países, torna-se necessária uma avaliação posterior. Os valores obtidos da razão T4:T8, são comparáveis com os reportados por outros autores em outras populações. Apesar deste trabalho, não incluir nos seus objectivos, uma avaliação do significado clínico das concentrações das sub-populações de linfócitos T, os resultados do mesmo estudo, permitem considerar que a razão T4:T8 possa vir a ser utilizada como um indicador do estado das subpopulações de linfócitos T, com fins de diagnóstico clínico.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram chegar as seguintes conclusões:

1. Os valores para as concentrações de leucocitos totais, linfocitos totais e das subpopulações de linfócitos T, obtidos nos indivíduos mocambicanos adultos sem manifestações aparentes de doença e que possam servir de referência, para avaliar os resultados obtidos em amostras de indivíduos doentes, apresentaram diferenças significativas segundo o sexo.
2. Para os indivíduos do sexo masculino determinaram-se os seguintes valores limites dos intervalos de referência com 95% de nível de confiança, para a concentração dos leucocitos totais encontra-se entre 1754 e 7622 células/mm³; para os linfocitos totais entre 587 e 4357 células/mm³; para os linfocitos T4 (CD4) entre 19 e 761 células/mm³; para os linfócitos T8 (CD8) entre 15 e 187 e para os linfocitos T (CD11) entre 68 e 1864 células/mm³.
3. Para os indivíduos do sexo feminino, determinaram-se os seguintes valores limites dos intervalos de referência com 95% de nível de confiança, para a concentração dos leucócitos totais encontra-se entre 2166 e 9746; para os linfócitos totais entre 2675 e 8029; para os linfócitos T4 (CD4) entre 55 e 707; para os linfócitos T8 (CD8) entre 39 e 419 e para os linfócitos T11 (CD11) entre 781 e 2074.

4. Os valores de referência obtidos para a razão T4:T8 não diferiram significativamente nos dois sexos e foram definidos os os valores limites de intervalos de referência com 95% de confiança, para o sexo masculino entre 0.88 e 3.04 e para o sexo feminino entre 0.79 e 2.63.
5. Os valores de referencia obtidos para as concentrações das diferentes populações celulares são mais baixos que os obtidos em outras populações europeias, americanas e inclusivamente africanas enquanto que os valores obtidos para a razão T4:T8 são comparáveis com os obtidos noutros estudos. Por essa razão a utilização no diagnostico clínico das concentrações das diferentes populações celulares deve aguardar pela avaliação das mesmas em diferentes grupos de doentes.
6. A tecnica de quantificação das subpopulações de linfocitos T utilizando anticorpos monoclonais e metodos imunoenzimaticos atraves da microscopia óptica revelaram um elevado indice de reproductibilidade quando realizada por pessoal treinado e portanto util para a utilização no diagnostico clínico nas nossas condições actuais. No entanto, a selecção do anticorpo monoclonal primario deve ser cuidadosa pois as sua qualidade parece afectar o grau de reproductibilidade da prova ao provocar uma deficiente intensidade de marcação das células positivas.

RECOMENDAÇÕES

1. Alargar a experiência acumulada dirigindo a atenção para os grupos de idade e sexo que apresentam diferenças significativas nas contagens das populações e subpopulações de linfócitos.
2. Re-analisar a luz dos resultados obtidos a consistência dos valores agora estimados para fins de referência.
3. Estudar em pacientes com doença por HIV os valores de concentração de linfócitos T4 (CD4) associados com predição da evolução para os estádios terminais da doença em Moçambique.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1]. Roitt, I. 1989. Essential Immunology. 9th Edition, Blackwell Scientific Publication. London.

- [2]. Clarck, W.R. 1986. The Experimental Foundations of Modern Immunology. Wiley, Canadá.

- [3]. Guttman, R.D., Bach, F.B., Bach, M.K., Chaman, H.N., David, J.R., Lindquist, R.R., Papermaster, D. and Schwartz, R. 1981. Immunology. A Scope Publication.

- [4]. Laurence, J. 1985. The Immune System in AIDS. Sci. Am., 253;70-79.

- [5]. Fishwild, D.M., Lifson, J.D. and Engleman, E.G. 1984. Human T lymphocytes subsets defined by monoclonal antibodies; functional analysis and application to blood donor screening program for AIDS carrier state. In: The Acquired Immune Deficiency Syndrome, Symposia on Molecular and Cellular Biology; Vol 16. (Ed) Gottlieb, M.S., Groopman, J.E. New York.

- [6]. Kishimoto, T. and Toshio, H. 1989. B Lymphocyte Activation, Proliferation and Immunoglobulin Secretion. In: Fundamental Immunology. Second edition. Reven Press Ltd. N.Y.

- [7]. Gills, S. 1989. T-cell and Derived Lymphokines. In: Fundamental Immunology. Second edition. Reven Press Ltd. N.Y.

- [8]. Giorgi, V.J. 1986. Lymphocytes Subset Measurements; significance in clinical medicine. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd Edition. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- [9]. Van Noorden, S. 1986. Tissue Preparation and Immunostaining Techniques for Light Microscopy. In: Modern Immunocytochemistry; modern methods and application. second edition. Wright, Bristol.
- [10] Marrack, P. Kappler, J.C. 1986. The T cell and its receptor. Sci. Am., 254; 28-37.
- [11] Ritter, M.A. 1986. Raising and Testing of Monoclonal Antibodies for Immunocytochemistry. In: Modern Immunocytochemistry; modern methods and application. second edition. Wright, Bristol.
- [12] Dako Laboratories. 1986. Special Instructions, Dako APAAP KIT System 40 K671, California.
- [13] Johnston, A., Thorpe, R. 1982. Immunochemistry in Practice. Blackwell Sci. Publications, Oxford.
- [14] Galfre, G. and Milstein, C. 1981. Preparation of Monoclonal Antibodies; strategies and procedures. In: Properties of Monoclonal Antibodies Produced by Hybridoma Technology and Their Application to Study of Diseases, Symposium. University of Singapore.
- [15] Erber, W.N., Pinching, A.J. and Mason, D.Y. 1984. Immunocytochemical detection of T and B cell populations in routine blood smears. The lancet, i, 1042.

- [16] Winchester, R.J. and Ross, G.D. 1986. Methods for Enumerating Cell Populations by Surface Markers with Conventional Light Microscopy. In: Manual of Clinical Laboratory Immunology. 3rd Edition. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- [17] Person, T.W. 1981. Properties of Monoclonal Antibodies and Analysis of their Specificities. In: Properties of Monoclonal Antibodies Produced by Hybridoma Technology and Their Application to Study of Diseases, Symposium. University of Singapore.
- [18] Greenwood, B.M., Whittle, H.C. 1981. Immunology of Medicine in The Tropics. London.
- [19] Wyler, D.J. 1976. Peripheral lymphocyte sub-populations in human falciparum malaria. Clinical and Experimental Immunology, 23, 471-476.
- [20] Ho, M., Webster, H.K., Looareesuwan, S., Supanaranond, W., Phillips, R.E., Chantharanich, D. and Warrell, D.A. 1986. Antigen-specific immunosuppression in Human Malaria due to Plasmodium falciparum. The Journal of Infectious Diseases, Vol. 153; No. 4
- [21] OMS/UISI. 1988. Immunologie de l'infection par le VIH et du SIDA. Bulletin de l'Organisation mondiale de la Santé, 66(1); 35-46.
- [22] Wells, R.A., Pavanand, K., Zolymi, S., Permpanich, B. and MacDermott, R.P. 1979. Loss of Circulating T Lymphocytes with Normal Levels of B and "null" Lymphocytes in Thai Adults with Malaria. Clinical and Experimental Immunology; 35, 202-209.

- [23] Programa Nacional de Controle da Tuberculose. 1989. Protocolo de pesquisa sobre SIDA e Tuberculose. Ministério da Saúde, Maputo.
- [24] Brain, P., Cox, J. Duursma, J. and Pudifin, D.J. 1976. T and B Lymphocytes in Three Groups. *Clinical and Experimental Immunology*; 23, 248-251.
- [25] Kornfeld, H. Stouwe, R.A.V., Lange, M., Reddy, M.M. and Grieco, M.H. 1984. T-lymphocyte subpopulations in homosexual men. *The N. Engl. J. Med.* Vol. 307,12; 729-31.
- [26] Smedman, L., Troye-Blomberg, M, Hedvig, P., Naucler, A., and Perlman, P. 1989. Phenotypic Characterization of Mononuclear White Cell Using Finger-Prick Blood and Light Microscopy. Ministério da Saúde da Guiné-Bissau.
- [27] W.H.O. 1980. Manual of Basic Techniques for Health Laboratories.
- [28] Boyum, A. 1978. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. In: *Immunochemistry in Practice.* (Ed.) Johnston, A., Thorpe, R. 1982.
- [29] Ford, W.L. 1978. The preparation and labelling of lymphocytes. In *Handbook of experimental immunology; cellular immunology.* (ed.) Weir, D.M. 1978. London.
- [30] Jackson, L.A. and Warner, N. 1986. Preparation, Staining and Analysis by Flow Cytometry of Peripheral Blood Leukocytes. In: *Manual of Clinical Laboratory Immunology.* 3rd Edition. Ed. American Society for Microbiology. Washington, D.C.

- [31] Vuillier, F., Lapresle, C. and Dighiero, G. 1988. Comparative analysis of CD4-4B4 and CD4-2H4 lymphocyte subpopulation in negative homosexual, HIV seropositive and healthy subjects. In: Clin. Exp. Immunol. 71, 8-12.
- [32] MMWR. 1989. Vol. 38. N°S-7. Centers for Disease Control.
- [33] Katzenstein, D.A., Latif, A.S., Grace, S.A., Basset, M., Mashu, A., Villiers, D.M., Carrow, S.W., Hendry, R.M., Marowa, E., and Emmanuel, J.C. 1990. Clinical and Laboratory Characteristics of HIV-1 Infection in Zimbabwe. In: Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes: 701-707, Riven Press, Ltd., N.Y.

APENDICES

ANEXOS I

Anexos I

Protocolo No. 1

Leucograma

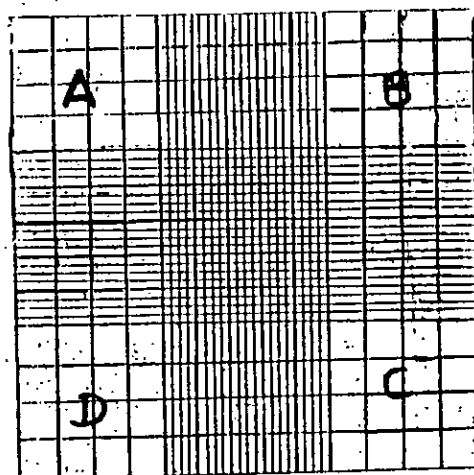
Material necessário

1. Pipetas graduadas com capacidade de 0.05 ml
2. Pipetas de 1 ml
3. Camara de Neubauer melhorada
5. Contador de mão

Procedimento

1. Pipeta-se 0.95 ml de solução de diluição (solução de Turk, reagente no. 1 em anexos I), para um pequeno tubo, ou outro recipiente limpo.
2. Agita-se gentilmente o sangue heparinizado, e chupa-se 0.05 ml deste, para um tubo de ensaio limpo. Não permitir a entrada de bolhas de água, pois isto falcificaria o volume desejado.
3. limpa-se os bordos da pipeta, com qualquer material absorvente, e verifica-se sempre a permanencia do sangue na marca de 0.05 da pipeta.
4. Lentamente, sopra-se o sangue para o tubo que contém o diluente. Chupa-se umas tres vezes, a solução de Turk, afim de aproveitar todo o sangue, deixa-se alguns minutos.
5. Limpa-se com etanol, a câmara de Neubauer.
6. Coloca-se a lamela sobre a câmara de Neubauer

7. Com uma pipeta, enche-se a câmara de Neubauer, dentro dos limites indicados, ver a figura abaixo. N.B.- quando se verificar um sobre enchimento, recomenda-se reiniciar com o processo de enchimento.
8. Deixa-se a câmara de Neubauer repousar por uns 2 minutos antes da contagem
9. conta-se todas as células existentes nas áreas indicadas no esquema abaixo.



Protocolo No.2

Contagem diferencial

Material

1. Microscópio com objectivas de imersão e oculares de x5 ou x6.
2. um esfregaço bem feito.
3. Laminas microscopicas
4. Corante de May-Grunwald (reagente No.2)
5. Corante de Giemsa (reagente No.3)
6. Agua tamponada (reagente No.4)
7. Sangue podendo ser o heparinizado

PROCEDIMENTO

1. Prepara-se o esfregaço do mesmo modo como se prepara para diagnóstico de Plasmodium. Deixar secar no ar e fixar seguidamente com metanol a 90%.

2. Preparam-se os corantes necessários segundo as indicações abaixo:

*Corante de May-Grunwald

Dilui-se o corante já preparado (ver a preparação de reagentes), em água tamponada na proporção de 1:1 isto é iguais volumes do corante e da água tamponada.

*Corante de Giemsa

Dilui-se o corante em água tamponada na proporção de 1:9 isto é 1 volume do corante para 9 volumes da água tamponada.

N.B. Cada corante prepara-se só para o uso diário.

3. Cobre-se a preparação com o corante de May-Grunwald diluído durante 15 minutos.

4. Retira-se sem (lavar) o corante de May-Grunwald e substituí-lo pelo corante de Giemsa por 20 minutos.

5. Lava-se a lamina com uma corrente de água tamponada. Neste passo não pode retirar o corante mecanicamente pois ocorrerá a deposição de partículas do corante.

6. Lava-se com uma corrente suave da água da torneira durante 2 a 3 minutos.

7. Retira-se a água da lamina e deixar secar no ar sobre a rampa vertical de secagem se tiver.

8. Examina-se a preparação ao microscópio usando a objectiva de imersão.

Protocolo No.3

ISOLAMENTO DE LINFOCITOS

Material

1. Sangue heparinizado
2. RPMI 1640
3. Histopaque (metrizoato de sódio)
4. Ficoll
5. Tubos de centrifuga com 13 mm de diametro
6. Centrifuga

PROCEDIMENTO

1. Dilui-se o sangue heparinizado em RPMI 1640 na razão de 5:3.
2. Pipeta-se 3 ml de Histopaque para um tubo de centrifuga.
3. coloca-se cuidadosamente a mistura RPMI e sangue heparinizado por cima do Histopaque. Não se pode romper o interface entre as duas componetes. Não se pode agitar.
4. Cetrifuga-se o tubo a a uma força de 400 x g durante 30 minutos a 20°C.
5. As células mononucleares formam uma camada no topo do fluido de separação (ver o esquema abaixo), enquanto os eritrócitos e outras células precipitam-se para o fundo do tubo.
6. Assim com uma pipeta Pasteur, retira-se a camada de plasma e depois o anel das células mononucleares para um tubo limpo.

7. Ressuspende-se o anel em 10 ml de RPMI 1640 e leva-se à centrifuga, durante 10 minutos a 200 x g, temperatura ambiente.
8. Retira-se o RPMI sobrenadante e deita-se fora. Seguidamente, ressuspende-se o botão de mononucleares em 5 ml de RPMI e centrifuga-se a 200 x g durante 10 minutos a 20-25 graus centigrados.
8. Repete-se o passo 7.

Alteração

Passos alterados:

1. Não se procede com a diluição em RPMI, deixa-se o sangue somente com heparina.
3. Pipeta-se 3 ml de sangue heparinizado, e colocados directamente sobre o Histopaque. Nota: A viscosidade do sangue é elevada nestas condições por isso exige-se mais cuidado, na colocação deste, sobre o Histopaque.

Protocolo No.4

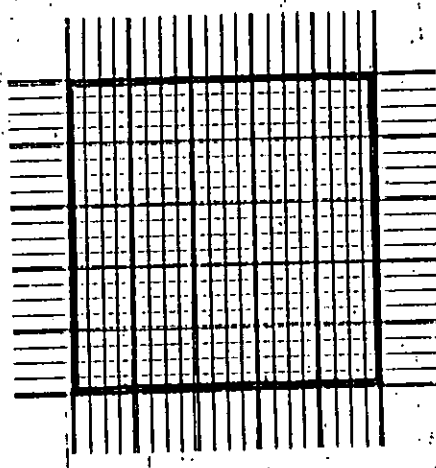
TESTE DE VIABILIDADE

Material

1. Suspensão de células
2. Eosina 0.5 % (p/v) em 0.9 % de cloreto de sódio.
3. Camara de Neubauer melhorado
4. Microscopio
5. Etanol a 70 %
6. detergente qualquer em uso comum no laboratório

Procedimento

1. Limpa-se a câmara de contagem sequencialmente com detergente, água e etanol e secar bem.
2. coloca-se a lamela da câmara correctamente.
3. Junta-se 10 μ l da suspensão celular em 10 μ l de Eosina ^{num} ~~um~~ pequeno tubo. Misture gentilmente.
4. Introduz-se a amostra na câmara de contagem observando os mesmos cuidados sublinhados no protocolo No.1.
5. Deixa-se as células se fixarem na câmara por 1 minuto e observa-se ao microscopio com objectiva de x20.
6. Conta-se o numero de linfocitos (mortos e vivos) em 5 quadrados grandes (80 quadrados pequenos) usando o contador para gravar os numeros contados. Se o numero total de células contadas for menor que 100 conta-se em 25 quadrados grandes (400 quadrados pequenos). Ver o desenho abaixo.



7. A concentração original da suspensão tomada= No. de células em 5 quadrados grandes $\times 10^4$ /ml.

Protocolo no. 5

PREPARAÇÃO DOS ESFREGAÇOS

1. Prepara-se 3 lamina para cada amostra. Estas são previamente limpas segundo o protocolo no.7, desta secção. Elas são rotuladas para a data de processamento, número da amostra e tipo do monoclonal (ver o passo 4 do protocolo no.6).
2. Com uma pipeta Pasteur, coloca-se uma gota a uma distancia de um terço da lamina, e puxa-se o esfregaço, como se fosse de sangue total usado para o diagnóstico da malaria.
3. Deixa-se secar numa superfície horizontal a temperatura ambiente, durante 2 a 4 horas de tempo.

Modificação

3. Secam-se as lamina, na incubadora durante 2 horas a 37°C.

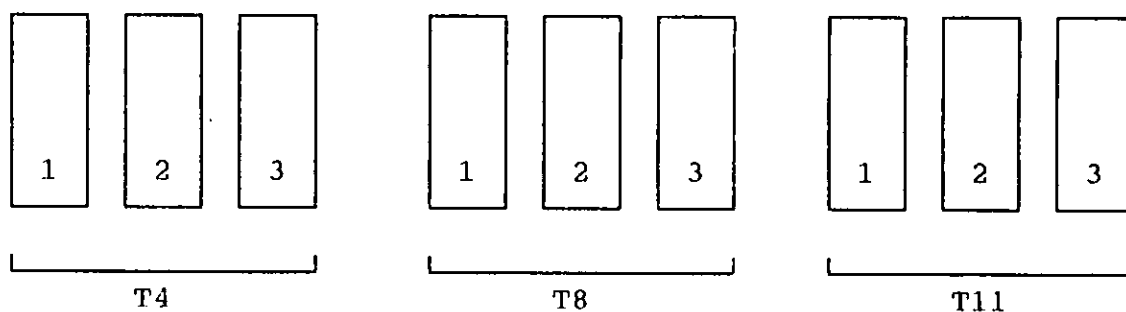
Protocolo No.6

CONTAGEM DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFOCITOS T

Procedimento:

1. Prepara-se o fixador de esfregaços de linfócitos, constituído por acetona-metanol absolutos proporção 1:1.
2. Fixam-se as lamina bem secas, durante 60 a 90 segundos.
3. Lavam-se as lamina numa solução tampão (TRIS, ver preparação de reagentes), durante 5 minutos.
4. Com papel absorvente, chupa-se o líquido excedente e colocam-se sobre uma superfície plana ou suporte, todas

as laminas segundo a ordem dos monoclonais a serem aplicados e segundo a ordem numerica das amostras, ver o esquema abaixo.



Supondo que são 3 amostras por processar.

5. Aplica-se o monoclonal correspondente ao rótulo, e deixa incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Retira-se o monoclonal excedente por cima da lamina, por uma corrente suave de tampão contido num esguincho.
7. Mergulham-se as lâminas, numa jarra de coloração cheia de tampão, o uso duma jarra vertical é recomendável, deixa-se ficar 5 minutos.
8. Repete-se o passo 4.
9. Aplica-se o LINK (no KIT vem indicado como amarelo, garrafa no.2), deixa-se incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
10. Idem aos passos 6 e 7.
11. Passo 4.
13. Aplica-se o complexo APAAP (garrafa no. 3, cor vermelha), deixa-se incubar a temperatura ambiente, durante 30 minutos.

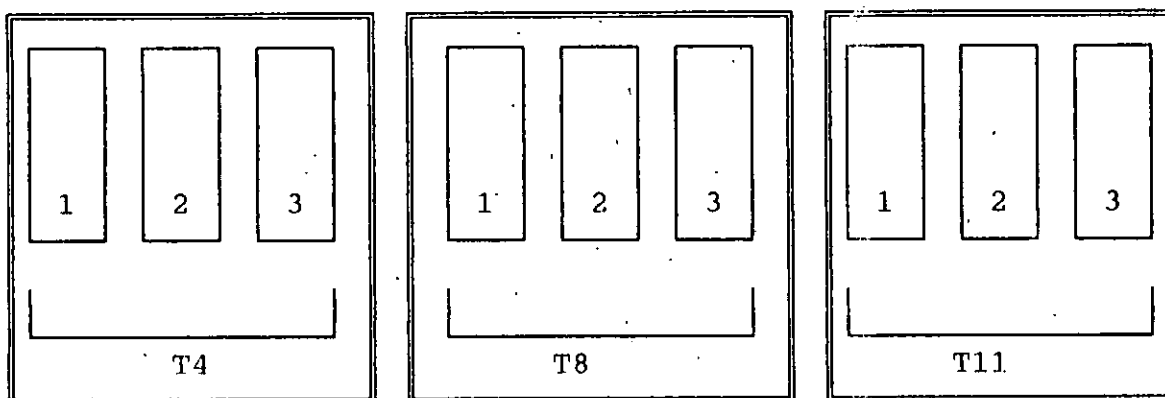
14. Faltando 10 minutos do fim do tempo da última incubação, prepara-se o substrato, dissolvendo um comprimido de Naphtol phosphate em 2 ml de tampão (contido no KIT), num tubo de ensaio contido no kit. Após a dissolução do mesmo, filtra-se usando, o funil e papel de filtro, fornecido no kit.
15. Passos 6 e 7.
16. Passo 4.
17. Aplica-se o substrato e deixa-se incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente.
18. Passos 6 e 7.

Coloração de contraste

19. Aplica-se hematoxilina de Mayer deixa incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
20. Mergulham-se as lamínas em água amoniacal por 45 a 60 segundos.
21. Montam-se as lamínas em gelatina glicerina previamente aquecida até 37°C.
22. Conta-se no microscópio óptico na objectiva de 20x.

Algumas modificações foram introduzidas nos passos seguintes:

4. As lâminas são colocadas em pequenas câmaras de incubação, que são pequenas caixas plásticas, com o fim de evitar a que o monoclonal seque por evaporação. Para preparam-se três caixinhas com tampas, cada uma representando um tipo de monoclonal;



****TODOS OS PASSOS QUE ENVOLVAM INCUBAÇÕES, ESTAS FORAM FEITAS NA INCUBADORA 37°C, NO MESMO INTERVALO DE TEMPO.

Protocolo No. 7

LAVAGEM DE LAMINAS MICROSCOPICAS

Este tipo de lavagem é recomendada para para eliminar fungos implantados nas laminas.

1. Laminas suspeitas de conter fungos, são mergulhadas numa solução sulfocrômica, (protocolo No.), durante 24 horas.
2. Lavam-se as lâminas, em água corrente.
3. Mergulham-se as lâminas em água com sabão líquido, durante 48 horas para o desengorduramento.
4. lavam-se as laminas em água corrente.
5. As lâminas podem ser sêcas por um pano limpo, embrulhadas e guardadas ou simplesmente guardadas em álcool absoluto até ao momento de utilização.

REAGENTES

Reagente No. 1

Solução de TURK

Acido acético glacial.....4 ml
Água destilada.....100 ml
Solução de azul de metileno.....10 ml

Prepara-se a solução de azul de metileno, dissolvendo-se 0.3 gr. de cristais de azul de metileno em 100 ml de água destilada. Filtra-se a solução de azul de metileno. Mistura-se a solução de azul de metileno, ao ácido acético glacial.

Reagente No. 2

Corante de May-Grunwald

Corante de May-Grunwald em pó.....5 gr.
Metanol.....1000 ml
Passar uma garrafa limpa com água destilada. Colocar o pó do corante de May-Grunwald, no frasco e juntar-lhe o metanol. Misture, até dissolver o corante. O corante é melhorado e amadurecido, por guardá-lo durante 1-2 semanas, misturando em intervalos regulares. Durante a preparação ou armazenagem do corante, deve-se ter o cuidado de não deixar entrar humidade no frasco.

Reagente No. 3

Corante de Giemsa

Pó do corante de Giemsa.....0.75gr
Metanol.....65ml
Glicerol.....35ml

Juntam-se todos os elementos num frasco limpo, previamente passada a álcool. Agita-se o frasco, 3 a 4 vezes por dia durante 4 dias consecutivos. Filtrar antes de usar.

Reagente No. 4

Água tamponada

Fosfato hidrogeno di-sodio.....3.76 gr
Fosfato di-hidrogeno de potassio.....2.1 gr
Água destilada.....1000 ml

Misturam-se todos os reagentes num único frasco, em qualquer ordem, e ajusta-se o pH, entre 7.0-7.2.

Reagente No. 5

Solução tampão salina (TBS) "Tris Buffer Solution"

a) Solução stock de TRIS (0.5 M, pH 7.6)

Dissolve-se 60.55 g de Trisma base em 1 litro de água destilada. Ajusta-se o pH para 7.6 com HCl concentrado.

b) Solução stock de sal NaCl (1.5 M)

Dissolve-se 87.66 g de NaCl em 1 litro de água destilada.

c) Solução final de TBS (0.05 M Tris, 0.15 M NaCl, pH 7.6)

Misturam-se 100 ml de cada solução das alíneas a e b, e ajusta-se o volume para 1 litro com água destilada.

Reagente No. 6

Glicerina Gelatina (meio de montagem)

Gelatina.....	10.0 g
Água destilada.....	60 ml
Fenol.....	0.25 g
Glicerina.....	70 ml

Dissolve-se a gelatina na água destilada quente; deixa-se arrefecer; acrescenta-se fenol, misturando bem até a dissolução completa; acrescenta-se a glicerina; filtra-se.

ANEXOS II

MAPA DE VALORES DE CONCENTRACAO (Nº DE CELULAS/MM³) DOS
DIFERENTES GRUPOS CELULARES DE 34 INDIVIDUOS DO SEXO
MASCULINO.

	IDADE	CONC_LEU	LIN_TOT	CON_CD11	CONC_CD4	CONC_CD8	CD4/CD8
1	19.00	4400.00	1049.10	546.26	239.70	106.00	2.26
2	40.00	5000.00	1547.30	548.44	144.80	90.03	1.61
3	20.00	7350.00	1586.00	721.13	142.80	125.50	1.14
4	26.00	7700.00	1566.00	1063.80	376.30	149.80	2.51
5	35.00	7650.00	3257.10	1773.90	264.90	130.40	2.03
6	31.00	4650.00	2311.30	611.07	137.80	74.92	1.84
7	30.00	2950.00	695.79	361.58	133.90	76.82	1.74
8	22.00	2500.00	790.50	477.27	112.30	92.83	1.53
9	34.00	6000.00	1625.20	1020.70	425.90	238.50	1.79
10	30.00	3200.00	2272.20	577.99	112.30	99.14	1.13
11	30.00	5250.00	1906.50	1101.40	451.70	245.70	1.84
12	34.00	6750.00	7612.90	1410.60	554.60	281.50	1.97
13	34.00	5700.00	1812.60	954.82	451.80	216.60	1.90
14	54.00	6250.00	1090.80	1458.50	708.80	300.40	2.36
15	40.00	3500.00	2096.50	576.90	259.30	190.40	1.57
16	32.00	4100.00	2786.40	703.68	303.60	205.30	1.48
17	39.00	2550.00	1752.40	529.47	312.40	117.50	1.81
18	26.00	4800.00	920.63	1107.60	515.60	215.00	2.40
19	36.00	4100.00	1719.80	1067.30	358.40	226.50	1.45
20	33.00	2800.00	902.34	539.53	215.80	156.00	1.38
21	35.00	3450.00	2209.50	755.34	160.80	64.83	2.48
22	35.00	4900.00	804.59	142.20	305.40	202.20	1.51
23	29.00	4750.00	708.00	1230.00	489.90	219.00	2.15
24	29.00	4850.00	1303.70	1282.40	553.20	265.60	2.08
25	34.00	4750.00	1576.90	1590.20	639.20	359.40	1.78
26	25.00	5500.00	1213.20	665.03	275.10	134.30	2.05
27	18.00	2900.00	3486.50	682.80	211.60	119.70	1.77
28	19.00	6050.00	1954.30	1552.80	842.80	268.30	3.14
29	20.00	4900.00	2202.50	1771.50	507.90	285.40	1.78
30	39.00	4900.00	890.80	1829.80	719.50	406.30	1.77
31	42.00	5250.00	2374.70	1331.00	690.10	252.20	2.74
32	51.00	4600.00	2414.70	1004.60	351.20	232.10	1.56
33	30.00	2300.00	2373.00	544.53	246.80	102.60	2.41
34	32.00	3100.00	1288.00	1309.90	409.90	110.40	3.71

MAPA DE VALORES DE CONCENTRACAO (Nº DE CELULAS/MM³) DOS
DIFERENTES GRUPOS CELULARES DE 36 INDIVIDUOS DO SEXO
FEMININO

	IDADE	CONC_LEU	LIN_TOT	CON_CD11	CONC_CD4	CONC_CD8	CD4/CD8
1	22.00	5100.00	1983.30	1222.00	393.00	256.20	1.53
2	17.00	7650.00	2431.00	1352.80	371.60	154.60	2.40
3	20.00	7650.00	1829.30	978.43	286.40	169.90	1.69
4	25.00	7600.00	2895.20	1712.10	604.40	326.70	1.84
5	34.00	3700.00	1135.00	814.40	303.40	117.60	2.57
6	29.00	4800.00	11631.00	760.07	263.50	182.30	1.44
7	27.00	5600.00	2100.00	1118.10	444.10	202.80	2.19
8	20.00	4300.00	1051.00	654.58	177.90	130.30	1.37
9	33.00	8000.00	2733.00	1536.50	565.70	389.20	1.45
10	32.00	5300.00	2153.10	1250.00	538.50	211.90	2.54
11	17.00	8250.00	2750.00	1364.00	462.80	224.80	2.06
12	17.00	6300.00	1999.00	1369.20	412.60	240.40	1.72
13	32.00	5550.00	2324.60	1176.90	606.20	256.50	2.36
14	28.00	10150.00	3500.00	1467.90	483.20	241.90	2.00
15	31.00	6050.00	2587.40	1762.30	561.70	351.20	1.60
16	17.00	4350.00	1479.80	664.69	150.20	99.88	1.50
17	19.00	5500.00	1849.10	919.09	252.30	251.90	1.00
18	18.00	4200.00	1848.00	1071.80	321.50	184.80	1.74
19	39.00	4500.00	2419.00	1464.00	421.80	262.10	1.61
20	39.00	5350.00	1414.80	621.80	161.60	103.20	1.57
21	27.00	6850.00	2354.60	1260.30	261.30	230.00	1.13
22	26.00	6150.00	2203.70	1342.90	393.10	268.00	1.47
23	19.00	6600.00	2260.00	1178.10	326.70	230.90	1.42
24	19.00	3650.00	1142.90	791.72	233.30	146.20	1.60
25	21.00	4500.00	1666.00	541.19	113.70	89.07	1.28
26	32.00	2750.00	1004.80	703.34	261.30	97.20	2.69
27	34.00	10350.00	14684.70	2341.10	892.60	370.50	2.41
28	31.00	3750.00	1687.50	977.46	388.30	205.90	1.89
29	15.00	5250.00	2064.30	1558.40	622.10	370.40	1.68
30	17.00	6000.00	2508.10	1274.50	265.50	163.60	1.62
31	27.00	3350.00	1479.50	951.10	212.10	154.90	1.37
32	29.00	5500.00	2101.00	1202.20	257.70	347.10	.74
33	33.00	9400.00	3247.20	2327.20	411.20	288.60	1.53
34	32.00	8550.00	3109.00	1868.50	521.90	512.50	1.01
35	18.00	6950.00	1537.60	989.23	461.70	204.50	2.26
36	23.00	4950.00	1289.40	1057.10	337.80	212.90	1.59

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO, PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL, APLICADO SOBRE OS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DOS LEUCOCITOS TOTAIS.

VARIABLE NAME: CONC_LEU N = 34

GRUPO DO SEXO MASCULINO

ARITHMETIC MEAN = 4688.2352941174

SAMPLE STD. DEV. = 1467.8400346092

SAMPLE VARIANCE = 2154554.3672014

COEFFICIENT OF VARIATION = 31.309009521151%

POPULATION STD. DEV. = 1446.0930540969

POPULATION VARIANCE = 2091185.1211073

COEFFICIENT OF VARIATION = 30.845146599685%

MINIMUM = 2300

MAXIMUM = 7700

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 4688.2352941174 AND STD. DEV. 1467.8400346092 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 6.000. D.F. = 5. P = .3062

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO
NORMAL, APLICADO SOBRE DA CONCENTRAÇÃO DOS LINFOCITOS T.

VARIABLE NAME: CON_CD11 N = 34

GRUPO DO SEXO MASCULINO

ARITHMETIC MEAN = 966.00117647061

SAMPLE STD. DEV. = 449.28501166594

SAMPLE VARIANCE = 201857.02170766

COEFFICIENT OF VARIATION = 46.509778932925%

POPULATION STD. DEV. = 442.62856943601

POPULATION VARIANCE = 195920.05048097

COEFFICIENT OF VARIATION = 45.820707077522%

MINIMUM = 142.2

MAXIMUM = 1829.8

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 966.00117647061 AND
STD. DEV. 449.28501166594 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 12.588. D.F. = 5. P = .2347

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL, APLICADO SOBRE OS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DOS LINFOCITOS COM MARCADOR CD4.

VARIABLE NAME: CONC_CD4 N = 34

GRUPO DO SEXO MASCULINO

ARITHMETIC MEAN = 371.06176470588

SAMPLE STD. DEV. = 195.41585341648

SAMPLE VARIANCE = 38187.355766491

COEFFICIENT OF VARIATION = 52.663969183506%

POPULATION STD. DEV. = 192.52064368255

POPULATION VARIANCE = 37064.198243947

COEFFICIENT OF VARIATION = 51.883719098668%

MINIMUM = 112.3

MAXIMUM = 842.8

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 371.06176470588 AND STD. DEV. 195.41585341648 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 4.588. D.F. = 5. P = .4682

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL, APLICADO SOBRE OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE LINFOCITOS COM MARCADOR CD8.

VARIABLE NAME: CONC_CD8 N = 34

GRUPO DO SEXO MASCULINO

ARITHMETIC MEAN = 187.09323529412

SAMPLE STD. DEV. = 86.324946628583

SAMPLE VARIANCE = 7451.9964104276

COEFFICIENT OF VARIATION = 46.14006834233%

POPULATION STD. DEV. = 85.045987826676

POPULATION VARIANCE = 7232.820045415

COEFFICIENT OF VARIATION = 45.456473983669%

MINIMUM = 64.83

MAXIMUM = 406.3

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 187.09323529412 AND STD. DEV. 86.324946628583 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 12.118, D.F. = 5, P = 2334

TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL
APLICADO SOBRE A RAZÃO DA CONCENTRAÇÃO DE LINFOCITOS
COM MARCADOR CD4 e CD8.

VARIABLE NAME: CD4/CD8 N = 34

GRUPO DO SEXO MASCULINO

ARITHMETIC MEAN = 1.9601470588235

SAMPLE STD. DEV. = .54005600901192

SAMPLE VARIANCE = .29166049286988

COEFFICIENT OF VARIATION = 27.551810798118%

POPULATION STD. DEV. = .53205473692055

POPULATION VARIANCE = .28308224307959

COEFFICIENT OF VARIATION = 27.143613257257%

MINIMUM = 1.133

MAXIMUM = 3.712

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 1.9601470588235 AND
STD. DEV. .54005600901192 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 6.471. D.F. = 5. P = .2531

RESULTADO DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO
NORMAL APLICADO SOBRE OS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DE LEUCOCITOS
TOTAIS:

VARIABLE NAME: CONC_LEU N = 36

GRUPO DO SEXO FEMININO

ARITHMETIC MEAN = 5956.944444447

SAMPLE STD. DEV. = 1895.9412580479

SAMPLE VARIANCE = 3594593.253968

COEFFICIENT OF VARIATION = 31.827412119245%

POPULATION STD. DEV. = 1869.4232911136

POPULATION VARIANCE = 3494743.4413578

COEFFICIENT OF VARIATION = 31.382251564508%

MINIMUM = 2750

MAXIMUM = 10350

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 5956.944444447 AND
STD. DEV. 1895.9412580479 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 1.333. D.F. = 5. P = .9315

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL, APLICADO SOBRE OS VALORES DA CONCENTRAÇÃO DOS LINFÓCITOS TOTAIS.

VARIABLE NAME: LIN_TOT N = 36

GRUPO DO SEXO FEMININO

ARITHMETIC MEAN = 2679.275

SAMPLE STD. DEV. = 2675.8018444011

SAMPLE VARIANCE = 7159915.5105003

COEFFICIENT OF VARIATION = 99.8703695739%

POPULATION STD. DEV. = 2638.376199207

POPULATION VARIANCE = 6961028.9685419

COEFFICIENT OF VARIATION = 98.473512394472%

MINIMUM = 1004.8

MAXIMUM = 14684.7

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 2679.275 AND STD. DEV. 2675.8018444011 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 64.000. D.F. = 5. P = 4.486

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO
NORMAL, APLICADO SOBRE OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE LINFOCITOS T.

VARIABLE NAME: CON_CD11 N = 36

GRUPO DO SEXO FEMININO

ARITHMETIC MEAN = 1212.3611111111

SAMPLE STD. DEV. = 431.72676976319

SAMPLE VARIANCE = 186388.00373016

COEFFICIENT OF VARIATION = 35.610410611697%

POPULATION STD. DEV. = 425.68833573649

POPULATION VARIANCE = 181210.5591821

COEFFICIENT OF VARIATION = 35.112338381289%

MINIMUM = 541.19

MAXIMUM = 2341.1

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 1212.3611111111 AND
STD. DEV. 431.72676976319 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 2.222. D.F. = 5. P = .8176

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA
DISTRIBUIÇÃO NORMAL, APLICADO SOBRE OS VALORES DE
CONCENTRAÇÃO DE LINFOCITOS COM MARCDOR CD4.

VARIABLE NAME: CONC_CD4 N = 36

GRUPO DO SEXO FEMININO

ARITHMETIC MEAN = 381.74166666667

SAMPLE STD. DEV. = 163.78306623615

SAMPLE VARIANCE = 26824.892785714

COEFFICIENT OF VARIATION = 42.904162824637%

POPULATION STD. DEV. = 161.49228116229

POPULATION VARIANCE = 26079.756875

COEFFICIENT OF VARIATION = 42.304075049607%

MINIMUM = 113.7

MAXIMUM = 892.6

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 381.74166666667 AND
STD. DEV. 163.78306623615 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 4.889. D.F. = 5. P = .4295

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO
NORMAL APLICADO SOBRE OS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE LINFOCITOS
COM MARCADOR CDB.

VARIABLE NAME: CONC_CDB N = 36

GRUPO DO SEXO FEMININO

ARITHMETIC MEAN = 229.17916666667

SAMPLE STD. DEV. = 95.130634043779

SAMPLE VARIANCE = 9049.8375335714

COEFFICIENT OF VARIATION = 41.509285258089%

POPULATION STD. DEV. = 93.800070136642

POPULATION VARIANCE = 8798.4531576389

COEFFICIENT OF VARIATION = 40.928707221049%

MINIMUM = 89.07

MAXIMUM = 512.5

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 229.17916666667 AND
STD. DEV. 95.130634043779 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 6.222. D.F. = 5. P = .2852

RESULTADOS DO TESTE CHI-QUADRADO PARA O AJUSTE DE UMA DISTRIBUIÇÃO NORMAL, APLICADO SOBRE A RAZÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES DOS LINFOCITOS COM MARCADORES CD4 E CD8.

VARIABLE NAME: CD4/CD8 N = 36

GRUPO DO SEXO FEMININO

ARITHMETIC MEAN = 1.7175

SAMPLE STD. DEV. = .46948108131668
SAMPLE VARIANCE = .22041248571428
COEFFICIENT OF VARIATION = 27.335143016983%

POPULATION STD. DEV. = .46291458895423
POPULATION VARIANCE = .21428991566666
COEFFICIENT OF VARIATION = 26.952814495152%

MINIMUM = .742
MAXIMUM = 2.688

NORMAL DISTRIBUTION GOODNESS OF FIT TEST:

THE HYPOTHESIS THAT THE POPULATION IS NORMAL OF MEAN 1.7175 AND STD. DEV. .46948108131668 CANNOT BE REJECTED AT THE 95% CONFIDENCE LEVEL

CHI SQUARE = 9.778. D.F. = 5. P = .0818

