
Expertos Invitados

CARACTERISTICAS DE LA TRANSMISION DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C ENTRE USUARIOS DE DROGAS INYECTABLES. ACTUALIZACION

Columnista Experto de SIIC
Dr. Campbell Aitken

Senior Research Fellow. Illicit Drug Use and Blood Borne Virus Epidemiology, Melbourne, Australia

La combinación de métodos de redes sociales y epidemiología molecular comenzó a utilizarse recientemente en la investigación de enfermedades infecciosas. La utilización conjunta de estas técnicas permite identificar y descifrar patrones de enfermedad en agrupaciones complejas de seres humanos; así, la primera resulta útil para evaluar cómo se transmite la infección, mientras que la segunda se aplica a las relaciones y conductas que posibilitan esta transmisión. A partir del año 2000 comenzamos un estudio en el cual se combinaron por primera vez los métodos de redes sociales con la epidemiología molecular a fin de avanzar en nuestro conocimiento sobre la epidemiología del virus de la hepatitis C (VHC) entre usuarios de drogas intravenosas (UDI), para lo cual reclutamos una cohorte de 199 UDI, de los cuales 138 tenían ARN positivo para VHC, en una zona utilizada para consumo de drogas en Melbourne, Australia. Estudiamos muestras de sangre obtenidas de los participantes, al tiempo que se evaluaron datos informados por ellos, por medio del análisis de redes sociales y análisis moleculares filogenéticos de dos regiones del genoma del VHC. Los hallazgos de este estudio (denominado en lo sucesivo como Redes I) fueron publicados en varios artículos entre 2004 y 2005,¹⁻⁴ sus principales resultados se detallan a continuación:

- hubo una baja correlación entre las relaciones identificadas por técnicas de redes sociales y las que se delinearon por datos filogenéticos;¹
- la distancia social (número de vínculos que separan a los UDI) mostró escasa relación con la distancia genética entre secuencias virales;¹
- el cambio del fenotipo del VHC entre UDI se presenta al menos tan frecuentemente como las infecciones en individuos no infectados previamente, mientras que las tasas de incidencia del VHC calculadas tradicionalmente representan una minoría en la transmisión real del VHC entre UDI;²
- algunos UDI pueden ejercer conductas de alto riesgo para infección por VHC, con frecuencia similar y durante períodos comparables a los de otros UDI, sin presentar marcadores de infección;³
- las infecciones por genotipos mixtos de VHC se presentan en un subgrupo significativo de UDI y no se detectan con facilidad por ensayos de sondas alineadas (*line-probe assay* [LiPA], Bayer Diagnostics), que es el método más común de genotipificación.⁴

Aunque todos los resultados son relevantes, para mantener la claridad y brevedad del presente artículo nos ocuparemos principalmente de los dos primeros, que pueden describirse simultáneamente como mediciones de la correspondencia entre los datos de redes sociales y redes moleculares. Además de explorar los motivos por los que se obtuvieron estos resultados en Redes I, describiremos nuestra investigación actual (Redes II) y mencionaremos algunos de los datos preliminares obtenidos; asimismo, efectuaremos una breve revisión sobre las nuevas investigaciones en este tema, conocidas luego de la publicación de nuestros datos.

Correlación entre redes sociales y datos moleculares

En Redes I se solicitó a los UDI que propusieran o presentaran a nuestros trabajadores de campo a los integrantes de su red, que eran las personas con quienes se inyectaban drogas al mismo tiempo y en igual ubicación, al menos una vez en los 6 meses previos. Nuestros registros reunieron 577 relaciones diádicas o de pares que se inyectan y 66 pares de UDI con infecciones identificadas como posiblemente relacionadas filogenéticamente. Entre los pares de UDI con infecciones por VHC genéticamente relacionadas, sólo el 18.2% estaban socialmente vinculados, mientras que únicamente un 3.4% de los sujetos con ARN positivo vinculados socialmente tenían infecciones relacionadas. El bajo nivel de correlación entre nuestros datos filogenéticos y de redes sociales pudo deberse a una combinación de los siguientes motivos:

- Por parte de la red social, se presenta una situación de captura incompleta de un cuadro complejo;⁵ por lo que nuestra habilidad de rastrear patrones de infección por VHC a través de la red social de UDI se vio disminuida por las limitaciones prácticas de encontrar y entrevistar a UDI específicos en un escenario callejero rápidamente cambiante.
- La naturaleza epidémica del VHC entre UDI dificulta la reconstrucción de patrones de infección; además, el VHC mantiene una elevada prevalencia entre UDI en Australia, ya que el 61% de los participantes en la encuesta del programa nacional de agujas y jeringas de Australia, tuvieron pruebas para anti-VHC positivas en 2005.⁶ Las mediciones recientes de incidencia entre UDI jóvenes o que se inician mostraron un 133% por año entre australianos que se han inyectado durante menos de 1 año⁷ y 41.8% por año entre UDI británicos menores de 30 años, o que se han inyectado por 6 años o menos.⁸ Los participantes en Redes I se habían estado inyectando durante más de 10 años en promedio y la prevalencia de anticuerpos contra VHC fue cercana al 85%; así, en la mayor parte de los casos, la primera exposición al VHC probablemente había ocurrido años antes de la entrevista, más allá de que para la compleja información de la red social pudo existir algún período mal recordado.
- Nos vimos obligados a confiar en lo informado por nuestros participantes, con respecto al uso de drogas inyectables en los 6 meses previos, a fin de asegurar una recuperación razonable de la información. También trabajamos sobre la base de la presunción de que así se maximizaban nuestras probabilidades de reclutar integrantes de la red de UDI; ya que era probable que las personas con las cuales nuestros entrevistados se hubieran inyectado recientemente podrían encontrarse más cerca que otros que hubieran compartido esta práctica en momentos anteriores. De hecho, estos métodos limitaron el volumen potencial de integrantes de la red, aunque probablemente permanecieron aquellos UDI en los cuales era más probable detectar infecciones relacionadas, debido a una menor cantidad de divergencias entre las secuencias del VHC.
- Las infecciones con genotipos múltiples del VHC no son bien identificadas por el ensayo de sondas alineadas (LiPA),^{9,10} pero pueden constituir una fracción importante de todas las infecciones.⁴ A lo largo del tiempo, el genotipo dominante detectado por LiPA puede variar¹¹ en personas infectadas con más de un genotipo del VHC; por lo que estas personas, que podrían haber sido reconocidas por presentar secuencias relacionadas del VHC, ya no serían identificadas como tales.

Redes II

La consecuencia práctica de haber hallado en Redes I una mala correlación entre nuestros datos sociales y moleculares, además del interesante descubrimiento de UDI expuestos a alto riesgo durante mucho tiempo, pero no infectados, fueron factores determinantes en nuestra decisión de realizar un segundo estudio, basado en los resultados del primero, pero evitando la mayor cantidad posible de errores. La recolección de datos para Redes II se llevó a cabo entre julio de 2005 y agosto de 2006, y en ese período trabajaron 5 investigadores externos que entrevistaron a los participantes y tomaron al menos una muestra de sangre venosa de 319 sujetos (y al menos 2 muestras de 173) que eran UDI actuales. Como se mencionó anteriormente, el reclutamiento se realizó en tres locaciones de la ciudad de Melbourne (capital del estado de Victoria, Australia; población en 2004: 3 592 975 habitantes),¹² cada una de las cuales aloja un escenario de consumo de drogas ilícitas, en las que existen sitios fijos dedicados al programa nacional de agujas y jeringas. Las muestras de sangre para la realización de análisis para VHC, VIH y virus de la hepatitis B fueron obtenidas luego de dar un asesoramiento completo; los resultados se entregaron en privado, también junto con un asesoramiento completo. Se solicitó a los participantes que propusieran o presentaran a los integrantes de su grupo o red (personas con las cuales se hubieran

inyectado drogas, en igual ocasión y lugar, con el mismo criterio utilizado para Redes I) para entrevistarlos. La recolección de datos se vio facilitada por el uso de computadoras de mano, sincronizadas con una base de datos central; la mayoría de las entrevistas fueron conducidas, mientras que la extracción de las muestras de sangre se realizó en una camioneta, que también fue utilizada para el transporte de los trabajadores de campo, desde y hacia los sitios de reclutamiento, ampliamente distanciados. Las principales diferencias entre Redes II y Redes I son las siguientes.

Diseño longitudinal en vez de transversal

Redes II es un estudio prospectivo longitudinal, en el cual los UDI serán entrevistados hasta nueve veces durante un período de 2 años, con repetición de las entrevistas aproximadamente cada 3 meses, lo que brinda la posibilidad de observar el espectro completo de la dinámica de la infección por VHC (infección incidental, remoción del virus, de los anticuerpos o de ambos, desarrollo de cronicidad y sobreinfección). Las entrevistas reiteradas también permiten observar la evolución de las redes, e incrementan nuestra capacidad para detectar nuevas infecciones por VHC; además de rastrear la transmisión, y detectar participantes que adquieren nuevos compañeros de inyección de drogas con ARN positivo para VHC.

Menor énfasis en la densidad de las redes

En Redes II se utilizan tres sitios de reclutamiento ampliamente distanciados entre sí, contra un sitio único en Redes I; además, mientras que en Redes I los trabajadores de campo sólo podían reclutar personas presentadas como integrantes de la red por los entrevistados, en Redes II esa regla fue flexibilizada. El efecto de esos cambios fue una menor densidad y complejidad de las redes, lo que simplificó las relaciones y facilitó el reconocimiento de los patrones de infección; las figuras 1 y 2 muestran cuán diferentes son las estructuras de las redes de relaciones entre usuarios de inyectables, que se produjeron en Redes I y Redes II hasta ahora. La dispersión geográfica de los sitios de reclutamiento tuvo como beneficio adicional la posibilidad de aplicar la epidemiología molecular "clásica", para demostrar cómo las infecciones por VHC son transportadas desde un lugar de la ciudad a otro; así, la investigación de 77 secuencias de la región central del genotipo 1a (derivadas de especímenes de los primeros UDI) nos permitió documentar infecciones por VHC relacionadas genéticamente, en dos pares de UDI que vivían a 40 y 50 km de distancia.¹³

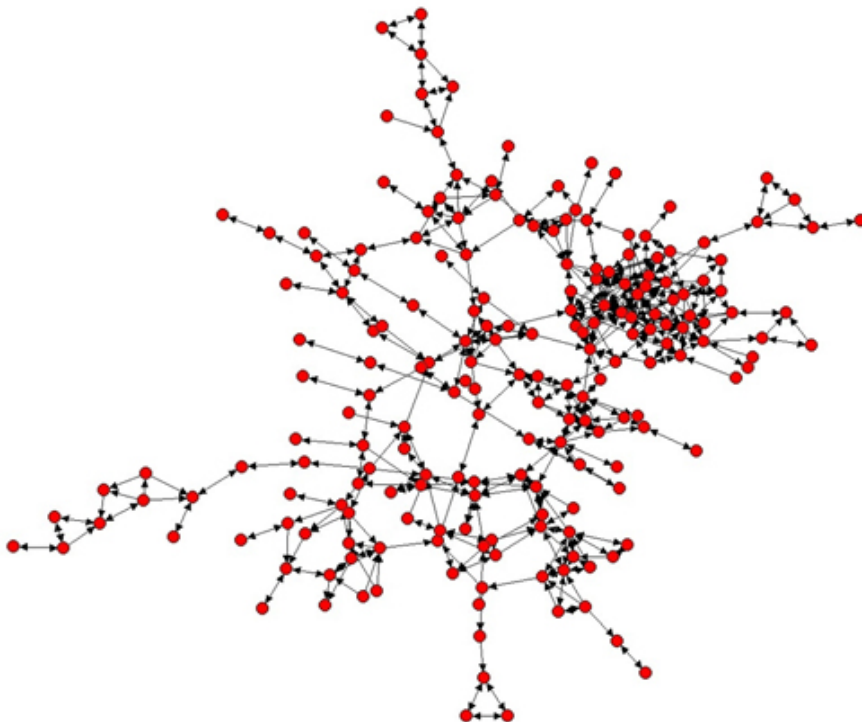


Figura 1. Redes I.

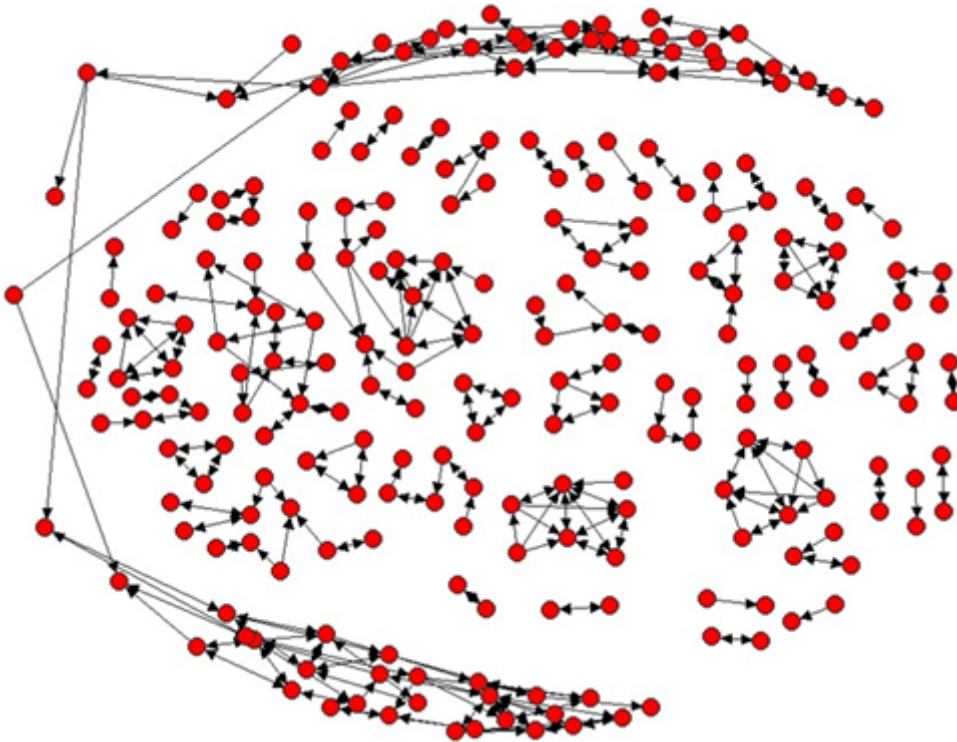


Figura 2. Redes II.

Enfasis en UDI jóvenes o de inicio reciente

En Redes I los UDI fueron reclutados basándose sólo en su identificación como miembros de las redes por otros entrevistados; mientras que en Redes II, las personas menores de 25 años que se habían estado inyectando por menos de tres años fueron reclutados en forma preferencial (denominados participantes primarios, con seguimiento longitudinal). Por su parte, los participantes secundarios no se incluyeron en el seguimiento, salvo que se hubiera probado que no habían estado expuestos al VHC. Se intentó incluir UDI jóvenes o de inicio reciente, a fin de obtener un número suficiente de UDI sin infección por VHC para poder efectuar comparaciones estadísticas con los individuos expuestos (algo que no fue posible en Redes I, ya que se reclutaron sólo 21 UDI no expuestos); además de permitirnos medir en forma más exacta la incidencia, e incluir UDI expuestos al VHC con historias de infección más corta y de menor complejidad, comparadas con las de Redes I. De esta manera, pudimos mejorar nuestra capacidad para detectar infecciones relacionadas por epidemiología molecular; estrategia que parece funcionar bien, ya que logramos identificar 25 casos de infecciones nuevas entre 105 UDI inicialmente negativos para anti-VHC, lo que indica una incidencia de 37.6% anual (95% IC 21.9-64.8). El promedio de uso de drogas inyectables de los individuos seguidos en Redes II fue de 7.8 años (95% IC 7.1-8.4), que resulta significativamente menor que el de Redes I, de 10.2 años (95% IC 9.2-11.3).

Inclusión de la inmunología

Encontramos un subgrupo de participantes de Redes I, que pese a encontrarse en situación de alto riesgo para infección por VHC, no presentaba evidencias de exposición,³ lo que coincide con informes previos de otros autores¹⁴ que plantearon como hipótesis que algunos individuos poseen o pueden adquirir una función inmune que los proteja de la infección por VHC, o bien les permita remover la infección rápidamente, sin producción detectable de anticuerpos. Nosotros comenzamos a colaborar informalmente con los principales inmunólogos australianos hacia el final del estudio

Redes I; mientras que la colaboración formal se inició en Redes II. Así, contamos con una gran reserva de muestras de sangre venosa (hasta 50 ml) obtenidas de UDI persistentemente negativos, seroconvertidos y UDI sobreinfectados con ARN positivo persistente; la cual brinda el material crudo para análisis que permiten el estudio de la inmunidad para VHC innata y adaptativa, y facilitan la creación de posibles vacunas.

Hasta el momento, las respuestas de células T específicas para VHC se identificaron en sujetos seronegativos y ARN negativos, contra determinantes de células T CD8⁺, los cuales también son reconocidos por participantes infectados por VHC, ARN positivos, o ambos. Esto confirma que los UDI persistentemente negativos han estado efectivamente expuestos al VHC, pero muestran una respuesta inmune más poderosa que les permiten frustrar tanto la viremia crónica como la producción de anticuerpos.

Análisis de curvas de fusión de PCR en tiempo real para discriminación del genotipo

En el estudio Redes I realizamos pruebas en una pequeña parte de la cohorte con análisis de movilidad heterodúplex (*heteroduplex mobility assay* [HMA]),⁴ con lo que detectamos que 3.6% de las muestras de UDI con ARN positivo para VHC contenían más de un genotipo viral. Nuestra experiencia subsecuente nos hizo comprender que la cifra real es varias veces mayor y supera probablemente el valor de 7.6% informado por Schroter y col.¹⁵ Mientras que la técnica HMA es útil para detectar genotipos múltiples, no permite discriminar fácilmente entre ellos; por lo tanto, nosotros desarrollamos una prueba que utiliza la curva de fusión en tiempo real, que incrementa significativamente la posibilidad de identificar los genotipos presentes en una infección mixta. Brevemente, la discriminación entre genotipos resulta posible por la implementación de una sonda específica para los productos de PCR de un genotipo, pero es lo suficientemente complementaria como para ligarse a otros; así, en el análisis de las curvas de fusión, la sonda se disocia de los productos de PCR menos específicos a una temperatura característica, menor a la de los específicos, que depende del genotipo.

Investigaciones nuevas luego de Redes I

Podría decirse que la principal razón por la cual los resultados de Redes I mostraron mala correspondencia entre los datos de redes sociales y secuencias del VHC, fue el hecho de que los datos utilizados provenían de UDI con antecedentes de infección por VHC complejos y de larga data. En el diseño de Redes II se buscó enmendar este problema, al enfocarse en usuarios de drogas inyectables más jóvenes o de inicio reciente; estrategia que parece ser exitosa, según se mencionó previamente. Uno de nuestros objetivos al realizar Redes II fue utilizar una combinación de análisis de redes sociales y epidemiología molecular, para comparar directamente la epidemiología social y molecular de pares de UDI que incluían al menos un episodio de infección por VHC. Estas personas, por definición, habrían adquirido la infección en forma reciente de otro UDI que, debido a que el evento de transmisión era reciente, probablemente continuara formando parte de la red social "infectante". Así, podríamos esperar que los vínculos sociales y los datos moleculares muestren una correspondencia mucho mayor que la observada en Redes I, en el cual la cohorte de UDI presentaba infecciones por VHC prevalentes, más que episódicas.

En la realización de un estudio retrospectivo de casos y controles, acerca de UDI con infecciones por VHC incidentales (n = 17) y sin evidencia de exposición (n = 42), Brewer y col.¹⁶ presentaron datos que confirman la lógica del abordaje bosquejado más arriba. En tres de cuatro pares de infecciones encontradas por estos autores, existían relaciones estrechas, y los UDI involucrados habían mencionado cada uno al otro como integrante de la red de usuarios de inyectables; así, aunque el número de casos es pequeño, el concepto mantiene su validez. Resultó llamativo que en el trabajo de Brewer y col.¹⁶ no hayan encontrado correspondencia entre la distancia genética y de red entre sujetos con infecciones nuevas, ya que esto sugiere que la distancia genética entre secuencias del VHC probablemente no sea representativa de la distancia social entre los huéspedes. Nosotros esperamos poder reproducir estos resultados con números superiores de casos nuevos y de controles, antes de la probable finalización de la recolección de datos para Redes II, a mediados de 2007.

Ha surgido mucha información nueva respecto de nuestra comprensión de los aspectos inmunológicos de la infección por VHC y se lograron avances importantes en el trabajo de preparación para la producción de una vacuna. Prince y col.¹⁷ mostraron que en chimpancés recuperados de infecciones previas por genotipo 1a o 1b se produjeron infecciones crónicas luego

de una prueba de provocación con genotipos heterólogos, lo que sugiere que se requerirán epitopes de varios genotipos para obtener una vacuna contra el VHC ampliamente efectiva. Encke y col.¹⁸ partieron de un enfoque diferente, en el que vacunaron ratones con células dendríticas con el *core* del VHC y detectaron importantes respuestas inmunes, tanto de tipo celular como humoral. Los hallazgos de Folgori y col.,¹⁹ quienes indujeron protección de genotipo cruzado para hepatitis aguda en chimpancés mediante una vacuna genética de células T para VHC, son prometedores. Así demostraron que se puede lograr una protección efectiva contra varias cepas del VHC por medio de la estimulación de la inmunidad celular únicamente.

La investigación inmunológica que realizamos en Redes II estuvo concentrada en mejorar nuestros conocimientos acerca de las respuestas efectivas de las células T (determinantes peptídicos específicos, frecuencias de células T, fenotipos funcionales y el repertorio de células T) que conducen a la resistencia al VHC y su remoción; además de identificar determinantes de células T reconocidos por los diferentes genotipos virales. Como ya se mencionó, actualmente existe una evidencia considerable de que las respuestas de inmunidad celular son esenciales en la resolución espontánea de la hepatitis aguda por virus C y para la protección a largo plazo frente a la infección persistente; en consecuencia, las estrategias dirigidas a potenciar las respuestas de células T específicas para VHC pueden cumplir un importante papel en la creación de vacunas. Sin embargo, aunque existen seis genotipos del VHC y numerosos subtipos, la mayor parte de los trabajos publicados se concentraron en el genotipo 1, que corresponde a un 60% de las infecciones en UDI australianos,^{20,21} mientras que unos pocos estudios estuvieron dirigidos al genotipo 3, el siguiente en frecuencia.²⁰ Nosotros estamos trabajando con cohortes protegidas de UDI (negativos para anti-VHC, para PCR y PCR-negativos con anti-VHC positivo), a fin de investigar la correlación entre la inmunidad protectora en la infección por VHC y facilitar el diseño de una subunidad efectiva como vacuna y estrategia inmunoterapéutica. Identificamos nuevos determinantes específicos para VHC en células T CD8⁺, desde el genotipo 3 restringido para un amplio número de alelos de HLA. Combinado con las secuencias del epitope de linfocitos T citotóxicos (CTL) (publicadas en http://hcv.lanl.gov/content/immuno/tables/ctl_summary.html) del genotipo 1 del VHC, el gran repertorio de péptidos asegura un amplio intervalo de estudio para UDI que muestran alta prevalencia de genotipo 3 y que en muchos casos son portadores de más de un genotipo viral. Nos proponemos efectuar un riguroso análisis longitudinal del repertorio de células T en UDI con resultados clínicos diferentes; principalmente resistencia viral (anti-VHC y PCR negativos), *clearance* o depuración (anti-VHC positivo con ARN negativo), o persistencia (anti-VHC y PCR positivos). Esta comparación revelará la especificidad y frecuencia de las células T CD8⁺ específicas para VHC asociadas con protección y permitirá conocer su composición clonal. Asimismo, los UDI infectados con genotipos del VHC diferentes del 1 (genotipos 2, 3 y 6) serán sometidos a tamizaje en el panel completo de péptidos del VHC a fin de identificar determinantes de células T con reconocimiento cruzado entre genotipos, útiles para la creación de futuras vacunas.

Conclusiones

Por medio de Redes II estamos intentando proseguir con la utilización de métodos de redes sociales y epidemiología molecular para mejorar nuestra comprensión acerca de la epidemiología del VHC, su virología y sus interacciones. Debido a la posibilidad de mapear los patrones de transmisión del virus entre redes y de caracterizar en términos biológicos y de conducta, tanto a la fuente de infección como al huésped, pensamos que este enfoque ofrece una excelente base para las investigaciones sobre la inmunología del VHC que puede resultar útil para facilitar el proceso de creación de una vacuna.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aitken CK, McCaw R, Bowden S, Tracy SL, Kelsall J, Higgs P, Kerger M, Nguyen H, Crofts N. Molecular epidemiology of the hepatitis C virus in a social network of injecting drug users. *Journal of Infectious Diseases* 190(9):1586-1595, 2004.
2. Aitken CK, Bowden S, McCaw R, Jardine D, Hellard M, Higgs P, Nguyen O, Crofts N. Change in hepatitis C virus genotype in injecting drug users. *Journal of Medical Virology* 74 (4):543-545, 2004.
3. Aitken CK, Bowden S, Hellard M, Crofts N. Indications of immune protection from hepatitis C infection. *Journal of Urban Health* 81(1):58-60, 2004.
4. Bowden S, McCaw R, White P, Crofts N, Aitken CK, Detection of multiple hepatitis C virus genotypes in a cohort of injecting drug users. *Journal of Viral Hepatitis* 12:322-324, 2005.
5. Rothenberg R, Baldwin J, Trotter R, Muth SQ, The risk environment for HIV transmission: results from the Atlanta and

- Flagstaff network studies. *J Urban Health* 78(3):419-432, 2001.
6. National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research. Australian NSP Survey National Data Report 2001-2005. National Centre in HIV Epidemiology and Clinical Research, The University of New South Wales, Sydney, NSW, 2006.
 7. Maher L, Jalaludin B, Chant KG, Jayasuriya R, Sladden T, Kaldor JM, Sargent PL. Incidence and risk factors for hepatitis C seroconversion in injecting drug users in Australia. *Addiction* 101(10):1499-508, 2006.
 8. Judd A, Hickman M, Jones S, McDonald T, Parry JV, Stimson GV, Hall AJ. Incidence of hepatitis C virus and HIV among new injecting drug users in London: prospective cohort study. *British Medical Journal* 330(7481):24-5, 2005.
 9. Hu YW, Balaskas E, Furione M, Yen PH, Kessler G, Scalia V, Chui L, Sher G. Comparison and application of a novel genotyping method, semiautomated primer-specific and mispair extension analysis, and four other genotyping assays for detection of hepatitis C virus mixed-genotype infections. *J Clin Microbiol* 38(8):2807-2813, 2000.
 10. Giannini C, Giannelli F, Monti M, Careccia G, Marrocchi ME, Laffi G, Gentilini P, Zignego AL. Prevalence of mixed infection by different hepatitis C virus genotypes in patients with hepatitis C virus-related chronic liver disease. *J Lab Clin Med* 134(1):68-73, 1999.
 11. Laskus T, Wang LF, Radkowski M, Nowicki M, Wilkinson J, Rakela J. Exposure of hepatitis C virus-negative recipients to > or = 2 infected blood donors. *Journal of Infectious Diseases* 183(4):666-669, 2001.
 12. Australian Bureau of Statistics, National Regional Profile: Melbourne (Statistical Division), 2006. www.abs.gov.au/AUSSTATS/abs@.nsf/Latestproducts/205Population/People12000-2004?opendocument&tabname=Summary&prodno=205&issue=2000-2004&num=&view= (last viewed 2 October 2006).
 13. McCaw R, Hellard M, Aitken C, Tray L, Revill P, Bharadwaj M, Bowden S. Virological and epidemiological factors influencing hepatitis C infection in injecting drug users. 13th International Meeting on Hepatitis C Virus & Related Viruses 27-31 August 2006.
 14. Mehta SH, Cox A, Hoover DR, et al. Protection against persistence of hepatitis C. *Lancet* 359(9316):1478-83, 2002.
 15. Schroter M, Feucht HH, Zollner B, Schafer P, Laufs R. Multiple infections with different HCV genotypes: prevalence and clinical impact. *J Clin Virol* 27(2):200-4, 2003.
 16. Brewer DD, Hagan H, Sullivan DG, Muth SQ, Hough ES, Feuerborn NA, Gretch DR. Social structural and behavioral underpinnings of hyperendemic hepatitis C virus transmission in drug injectors. *Journal of Infectious Diseases* 194(6):764-72, 2006.
 17. Prince AM, Brotman B, Lee DH, Pfahler W, Tricoche N, Andrus L, Shata MT. Protection against chronic hepatitis C virus infection after rechallenge with homologous, but not heterologous, genotypes in a chimpanzee model. *Journal of Infectious Diseases* 192(10):1701-9, 2005.
 18. Encke J, Findelee J, Geib J, Pfaff E, Stremmel W. Prophylactic and therapeutic vaccination with dendritic cells against hepatitis C virus infection. *Clin Exp Immunol* 142(2):362-9, 2005.
 19. Folgari A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, Pezzanera M, Tafi R, Arcuri M, Fattori E, Lahm A, Luzzago A, Vitelli A, Colloca S, Cortese R, Nicosia A. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Naure Medicine* 12(2):190-7, 2006.
 20. Freeman AJ, Zekry A, Whybin LR, Harvey CE, van Beek IA, de Kantzow SL, Rawlinson WD, Boughton CR, Robertson PW, Marinos G, Lloyd AR. Hepatitis C prevalence among Australian injecting drug users in the 1970s and profiles of virus genotypes in the 1970s and 1990s. *Med J Aust* 172(12):588-91, 2000.
 21. McCaw R, Moaven L, Locarnini SA, Bowden DS. Hepatitis C virus genotypes in Australia. *J Viral Hepat* 4(5):351-7, 1997.

● REARREGLOS DEL GEN BCL-2 EN PACIENTES ARGENTINOS CON LINFOMA NO HODGKIN

Columnista Experto de SIIC

Dr. María Fernanda Noriega

Becaria. Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina. Genética Humana, Orientación: Biología Molecular, Buenos Aires, Argentina

Introducción

Los linfomas no Hodgkin (LNH) constituyen un grupo heterogéneo de neoplasias del sistema linfoide que presentan un amplio espectro de variación desde los puntos de vista clínico, morfológico, inmunofenotípico, citogenético y molecular. Son tumores que resultan de la expansión clonal de células linfáticas B o T transformadas en diferentes puntos de sus vías de diferenciación. Entre las neoplasias a células B maduras los tipos más comunes son los linfomas foliculares (LF) y los B difusos a células grandes (LBDCG), los que juntos constituyen más del 50% de todos los LNH. El LF es una neoplasia indolente caracterizada por la proliferación de células B provenientes del centro folicular del nódulo linfático. Es la forma más común de los LNH del adulto y representa alrededor del 35% al 40% de los casos. El LBDCG es una neoplasia agresiva de células B maduras, clínicamente heterogénea, que representa aproximadamente el 30% al 40% de los LNH.¹ El 25% al 35% de los LF muestran transformación a LBDCG secundario (LBDCG-S), situación que se encuentra acompañada de un curso clínico más agresivo, resistencia al tratamiento y corta supervivencia.²⁻⁴ La translocación t(14;18)(q32;q21) es la anomalía más frecuente en LNH se la

encuentra asociada aproximadamente al 50%-85% de los LF, al 15%-30% de los LBDCG⁵⁻⁷ y, sólo ocasionalmente, a otros subtipos histológicos.⁵ A nivel molecular esta translocación determina la yuxtaposición del protooncogén BCL-2, ubicado a nivel de 18q21.3, con una de las regiones JH de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (Igs), localizada en 14q32.3, resultando en la desregulación y sobreexpresión de dicho oncogen.^{6,8,9} El gen BCL-2 consta de tres exones, la región codificadora abarca la zona 3' del segundo exón y la 5' del tercero, la dirección de transcripción es hacia el centrómero. El 60% a 70% de los puntos de ruptura del gen BCL-2 se encuentran en una región de 150 pb conocida como *MBR* (*mayor breakpoint region*) que mapea en la zona 3' no codificadora del tercer exón,¹⁰ en tanto que el 15% al 20% de ellos se producen en un segundo *cluster* denominado *mcr* (*minor cluster region*) que dista aproximadamente 30 kb "río abajo".¹¹ Jäger y col.¹² sugieren que la t(14;18) es un proceso bastante más complejo que el que previamente se había descrito, que involucra la recombinación V(D)J a nivel del cromosoma 14 y un mecanismo adicional, aún no bien identificado, que produce las rupturas iniciales en el cromosoma 18. En todos los casos la región codificadora del gen permanece sin alteración y con sus promotores en la vecindad de secuencias estimuladoras de las Igs. El producto codificado por el gen BCL-2 cumple, entre otras funciones, la tarea fisiológica de bloquear la entrada de las células B en apoptosis; de esta manera, la proteína Bcl-2 en expresión permanente confiere al clon neoplásico con la t(14;18) la capacidad de inmortalizarse.¹³ En los últimos años se detectaron discrepancias entre los resultados citogenéticos y moleculares de la t(14;18), habiéndose determinado que la falla de los métodos moleculares convencionales se encontraba relacionada con la presencia de un porcentaje importante de casos en los cuales los puntos de ruptura de la translocación se ubican por fuera de las secuencias específicas de los *primers* utilizados hasta ese momento. Esto impide la amplificación por PCR anidada (PCR-N) y hace necesario el empleo de técnicas de PCR de larga distancia (PCR-LD)¹⁴⁻¹⁶ que permiten amplificar largos fragmentos de ADN y detectar translocaciones cuyos puntos de ruptura abarcan una amplia región cromosómica, por lo que es de gran utilidad para el abordaje diagnóstico.

Por otra parte, diferentes trabajos describieron variaciones geográficas en la incidencia y el comportamiento de los LNH¹⁷⁻²⁴ así como en la frecuencia de la translocación t(14;18) en LF, que parece ser significativamente más baja en los países asiáticos que en los occidentales,^{7,25,26} y con muy escasos datos provenientes de América latina.^{27,28} Esto determinó nuestro interés en evaluar la frecuencia de la t(14;18) en pacientes argentinos con LF y su progresión a LBDCG-S, así como en LBDCG *de novo*, y comparar estos datos con las series ya publicadas a fin de caracterizar nuestra población dentro de las diferentes regiones geográficas.

Materiales y métodos

Se analizaron 144 pacientes con LNH: 98 con diagnóstico de LF y 46 con LBDCG -29 *de novo* y 17 LBDCG-S a LF- admitidos en nuestro instituto entre 1993 y 2004. La distribución por sexo y edad se muestra en la tabla 1. En cuanto a los pacientes con diagnóstico de LBDCG *de novo*, ninguno presentó historia previa de LF y sus estudios histopatológicos no mostraron estructuras foliculares. Se empleó la clasificación de la Organización Mundial de la Salud.¹

Tabla 1: Frecuencia y distribución de los rearrreglos del gen BCL-2 en pacientes con LNH

Diagnóstico (n° de casos)	Sexo (%)		Edad media (años) (rango)	Rearreglos del gen		BCL-2 (%)		Total
	F	M		MBR-JH	mcr-JH	MBR-LD	mcr-LD	
LF (98)	43 (44)	55 (56)	52 (29-82)	38 (38,8)	15 (15,3)	10 (10,2)	14 (14,3)	77 (78,6)
LBDCG <i>de novo</i> (29)	17 (59)	12 (41)	58 (26-76)	7 (24,1)	1 (3,4)	4 (13,8)	3 (10,3)	15 (51,6)
secundarios (17)	8 (47)	9 (53)	61 (33-79)	6 (35,3)	3 (17,6)	3 (17,6)	2 (11,8)	14 (82,3)

La extracción del ADN genómico y las amplificaciones por PCR-N y PCR-LD de los rearrreglos moleculares del gen BCL-2 se efectuaron de acuerdo con lo previamente descrito.²⁹ Se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Gribben y col.²⁶ para la técnica de PCR-N y por Akasaka y col.¹⁵ para la técnica de PCR-LD. Asimismo, se diseñó una PCR-LD multiplex que permite amplificar simultáneamente los rearrreglos MBR/IgH y mcr/IgH (Figura 1). Esta contiene: 0.2 μ M de cada *primer* y 0.7 mM de dNTPs. El ciclado consta de 2 min de desnaturalización a 94°C, 4 ciclos compuestos por 20 seg a 94°C y 13 min de *annealing* a 72°C, 7 ciclos de 20 seg a 94°C y 13 min a 70°C, y de 31 ciclos compuestos por 20 seg a 94°C, 13 min a 68°C, incrementando en 15 segundos cada ciclo, se obtienen bandas de 1.9 a 10.7 kb para MBR/IgH y de 1.9 a 9.4 kb para mcr/IgH.

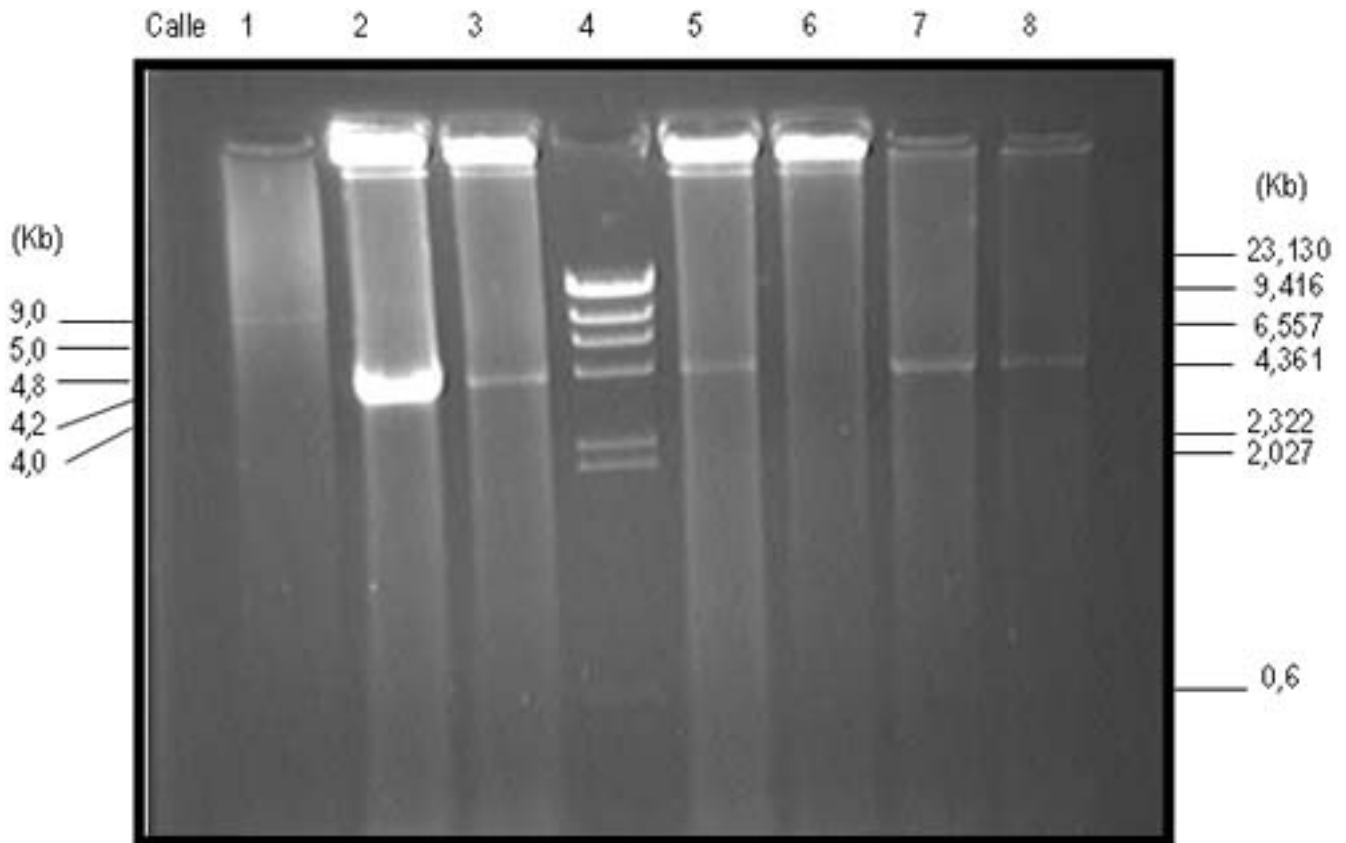


Figura 1. PCR multiplex de larga distancia. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, evidenciando los rearrreglos moleculares MBR-JH y mcr-JH del gen BCL-2. Calle 4: marcador de peso molecular DNA/lambda Hind III. Calles 1 a 3: pacientes positivos para el rearrreglo MBR-JH. Calles 5, 7 y 8: pacientes positivos para el rearrreglo mcr-JH. Calle 6: control negativo para ambos rearrreglos.

Para el análisis estadístico de las frecuencias poblacionales se utilizó el intervalo de confianza del 95%, calculado como: $a \pm 1.96[a(1-a)/n]^{1/2}$ donde a es el número de casos positivos en la población estudiada y n el número total de casos evaluados. Se empleó la prueba de χ^2 para la comparación entre poblaciones.

Resultados

En la tabla 1 se muestran la frecuencia y la distribución de los rearrreglos moleculares del gen BCL-2 en pacientes con LF, LBDCG *de novo* y LBDCG-S.

El análisis de los datos en LF muestra 54.1% (53/98) de rearrreglos mediante PCR-N y un incremento del 24.5% al emplear la técnica de PCR-LD, obteniéndose un total de 78.6% de casos positivos para los rearrreglos moleculares del gen BCL-2. Al evaluar los 29 pacientes con diagnóstico de LBDCG *de novo* utilizando la técnica de PCR-N se halló 27.5% (8/29) de pacientes positivos, y al analizar los restantes con la técnica de PCR-LD se detectaron 7 (24.1%) pacientes positivos adicionales, lo que resultó en un total de 15 casos (51.6%) portadores de la t(14;18). Por otro lado se analizaron 17 pacientes con LBDCG-S, se observaron 9 (52.9%) casos positivos por PCR-N, con un incremento de 29.4% (5 pacientes) con la PCR-LD: 3 (17.6%) positivos para MBR/IgH y 2 (11.8%) para mcr/IgH, mostrando un total de 14 casos positivos (82.3%). En conclusión, al comparar el porcentaje total de rearrreglos del gen BCL-2 se advierte que los LBDCG-S presentarían una frecuencia similar a la observada en los LF, lo que sugiere la existencia de una entidad diferente de los LBDCG *de novo*. En lo que respecta a la frecuencia de los rearrreglos MBR y mcr en cada subtipo histológico se observa que, en todos los casos, el rearrreglo MBR-JH es el que se encuentra en mayor proporción, dato que concuerda con la literatura.

Comparación de los resultados del presente estudio con datos de la literatura

Teniendo en cuenta las frecuencias informadas en la literatura respecto de la variación en la

distribución geográfica de los rearrreglos moleculares del gen BCL-2, se compararon nuestros datos con los previamente publicados. Para ello se tomaron los resultados de PCR-N tanto para MBR como para mcr que cuentan con mayor número de publicaciones, debido a que la técnica de PCR-LD se ha incorporado recientemente como primer abordaje diagnóstico.

La comparación de nuestros datos de LF con los resultados de la literatura muestra diferencias estadísticamente significativas respecto de los datos agrupados de EE.UU. ($p < 0.0001$) y superposición con los de las series de Europa y Asia (tabla 2). Estas diferencias desaparecen cuando se utiliza la PCR-LD, lo cual sugiere una distribución diferente de los puntos de ruptura característica de cada región. Asimismo, la correlación de los datos de la población de EE.UU. con las de Europa y Asia también mostró diferencias significativas ($p < 0.0001$). Cuando se analizaron los puntos de ruptura del gen BCL-2 se observó que nuestros resultados para MBR fueron significativamente menores que los encontrados en la serie de EE.UU. ($p < 0.0001$), en tanto que los valores de mcr mostraron un incremento significativo respecto de los resultados de Europa ($p = 0.002$).

Tabla 2: Rearreglos del gen BCL-2 en pacientes con LF y LBDCG *de novo* de diferentes regiones geográficas.

Datos Agrupados (referencias)	Nº de Pacientes	Rearreglos del BCL-2 (%; CI95%)		
		MBR	mcr	Total
<u>Linfoma Folicular</u>				
USA (26,30-33)	323	211 (65; 60-70)	43 (13; 10-16)	254 (79; 74-84)
Europa (6,34-41)	353	173 (49; 44-54)	16 (5; 3-7)	189 (54; 49-59)
Asia (25,42-44)	125	60 (48; 39-57)	12 (10; 5-15)	72 (58; 49-67)
<u>América del Sur</u>				
<i>Presente estudio</i>	98	38 (39; 29-49)	15 (15; 8-22)	53 (54; 44-64)*
<u>Linfoma B difuso a células grandes <i>de novo</i></u>				
USA (6,45-46)	177	21 (12; 8-16)	6 (3; 1-5)	27 (15; 10-20)
Europa (37,47)	80	13 (16; 8-24)	1 (1; 0-3)	14 (17; 9-25)
América del Sur	29	7 (24; 9-39)	1 (3; 0-9)	8 (27; 11-43)
<i>Presente estudio</i>				

* Diferencias significativas respecto de los datos agrupados de USA $p < 0.0001$.

Nuestra evaluación de los LBDCG *de novo* (tabla 2) mostró frecuencias del 27% utilizando la técnica de PCR-N, valor que no presenta diferencias significativas con lo observado en las poblaciones de Europa y EE.UU., encontrándose además una distribución similar en los puntos de ruptura.

Discusión

El análisis genético es quizás el medio más poderoso para resolver la complejidad biológica de los tumores e incrementar el conocimiento de su comportamiento clínico. Esto involucra los análisis citogenéticos, moleculares y citomoleculares que, aplicados al estudio de los LNH, demostraron la presencia de múltiples rearrreglos genéticos asociados a diferentes histologías y evolución clínica.

Entre ellos se destaca la translocación t(14;18), considerada la anomalía más frecuente en esta neoplasia,⁵⁻⁷ situación que se ve reflejada en nuestros resultados, que muestran su alta incidencia, tanto en LF como en LBDCG.

Simultáneamente, se describieron variaciones geográficas en la incidencia y comportamiento de los LNH. En particular, la mayoría de los linfomas de Occidente son de origen B, mientras que en Oriente son prevalentes los linfomas a células T.^{19,20} En EE.UU. y los países de Europa occidental aproximadamente un tercio de los LNH son de histología folicular,^{20,23} a diferencia de los países asiáticos, donde sólo 3% a 13% de los linfomas pertenecen a este subtipo histológico.^{17,18,21,22,48}

Asimismo, los datos provenientes de países africanos muestran frecuencias similares a las asiáticas, con valores entre 1.5% y 13.3%,^{49,50} con una incidencia mayor en Sudáfrica (33%).²⁰ Los escasos datos de América latina muestran incidencias bajas, tal es el caso de México (4.5%)²⁷ y Ecuador (7.7%).²⁸ Estas variaciones en la frecuencia de los LF en diferentes regiones geográficas parecen estar relacionadas fundamentalmente con el medio ambiente, situación que se ve reflejada en los estudios de emigrantes asiáticos en EE.UU., donde éstos mantienen el riesgo de su país de nacimiento, en tanto que sus descendientes nacidos en EE.UU. presentan incidencias similares a las de la población blanca de ese país.

Diferentes estudios detectaron una marcada variación geográfica en la frecuencia de la t(14;18) en los LF, observándose valores significativamente más altos en la población de EE.UU. que en los países asiáticos (excepto un estudio reciente que muestra valores más altos en diferentes grupos étnicos),⁴⁴ con frecuencias intermedias en la población europea.^{20,24} Estos hallazgos parecen sugerir la existencia de diferentes factores que podrían influir la aparición de estos linfomas.

En el presente trabajo evaluamos la frecuencia de la t(14;18) en una serie de pacientes con LF utilizando las técnicas de PCR-N y PCR-LD. Por PCR-N, observamos valores similares a los encontrados en las series provenientes de Europa y Asia, pero significativamente más bajos que los informados en pacientes de EE.UU. De esta manera, nuestros resultados confirmarían, en la frecuencia de los rearrreglos moleculares del gen BCL-2, la presencia de un gradiente que va desde rangos relativamente bajos para los países asiáticos y europeos y entre los que se incluye también nuestro estudio (54%) hasta valores más altos (79%) para las series estadounidenses. Con respecto a los puntos de ruptura del gen BCL-2, nuestros datos muestran valores de MBR significativamente menores que aquellos referidos en las series de EE.UU., sin encontrar diferencias respecto de los datos asiáticos y europeos. Por el contrario, nuestra frecuencia de rearrreglos en mcr fue similar a la observada en las series de EE.UU. y Asia, y más alta respecto de la estimada para Europa.

La introducción de la PCR-LD permitió incrementar el número de casos positivos, llegando así a una frecuencia total del 78.6%, similar a la observada en las series de EE.UU., lo que muestra la alta proporción de puntos de ruptura localizados entre MBR y mcr (24.5%). Estos datos resultan concordantes con los descritos por Albinger-Heigy y col.⁴¹ para pacientes europeos, quienes encontraron 36% de casos positivos por PCR-N, alcanzando una frecuencia del 71% por la técnica de PCR-LD. Estos hallazgos, podrían sustentar la hipótesis de que los LF constituirían una enfermedad heterogénea, con entidades morfológicamente similares pero con diferentes rearrreglos moleculares y distintas manifestaciones clínicas,²⁴ lo que indica que las diferencias geográficas podrían estar relacionadas con la distribución de los puntos de ruptura que se encuentran ampliamente esparcidos entre MBR y mcr.⁴¹ Por otro lado, los LBDCG representan un grupo heterogéneo de enfermedades linfoides en las que no existen indicadores morfológicos, clínicos, inmunohistoquímicos o genéticos confiables que puedan ser usados para definir subtipos.¹

Actualmente se considera que existen tres grandes subgrupos de LBDCG *de novo*: uno, con un perfil de expresión génica correspondiente al de las células del centro germinal (CG); otro, similar al de los linfocitos B activados,⁵² y un tercero –perfil denominado tipo 3–,⁵¹ con expresión heterogénea. Datos recientes^{52,53} indican que la t(14;18) se encuentra asociada al subtipo CG, lo cual sugiere que desempeñaría un papel importante en la patogénesis de este subgrupo de LBDCG primarios.

Tal como comentamos previamente, los rearrreglos del gen BCL-2 han sido detectados en, aproximadamente, un cuarto de los LBDCG *de novo*. En nuestro estudio, el análisis por PCR-N mostró valores similares a los informados en la literatura, sin verificarse diferencias geográficas. Simultáneamente, los pacientes que resultaron negativos con dicha técnica fueron analizados por PCR-LD, y se observó un incremento del 24.1% en la frecuencia de esta alteración genómica, llegando a un total de 51.6% de los casos con la t(14;18). En este subtipo histológico también

encontramos una alta proporción de puntos de ruptura localizados entre MBR y mcr que confirman la importancia del uso de la técnica de PCR-LD en ambos tipos de pacientes. Cabe destacar que éste es, según nuestro conocimiento, el primer análisis de la frecuencia de los rearrreglos del gen BCL-2 en LBDCG empleando PCR-LD.

Asimismo, se evaluaron pacientes con LBDCG-S, y se encontró una frecuencia total de rearrreglos similar a la observada para los LF (82.3%). Estos datos resultan particularmente interesantes ya que muestran un comportamiento diferente entre los LBDCG *de novo* y los LBDCG-S, indicando que se trataría de entidades distintas. Esto resulta concordante con un reciente análisis de los perfiles de expresión génica en ambos subtipos de LBDCG, que muestra una expresión diferente en los linfomas *de novo* respecto de los secundarios, así como una gran similitud entre los linfomas transformados y los LF. Esto podría sugerir la presencia de caminos alternativos en el desarrollo de ambos subtipos de LBDCG, que podrían estar relacionados con el diferente comportamiento clínico de estos linfomas morfológicamente similares.⁵⁴ Finalmente, resulta de gran interés el análisis de los puntos de ruptura de los rearrreglos del gen BCL-2 a fin de poder establecer su impacto clínico con certeza. Hasta el presente existen resultados escasos y contradictorios sobre su eventual correlación con la evolución clínica de los pacientes con LF,^{33,55,56} con un estudio reciente que encuentra asociación entre el tipo de rearrreglo molecular y el grado histológico de estos linfomas.⁵⁷ Esta situación muestra la importancia de continuar con este tipo de estudios tendientes a lograr una mejor caracterización biológica de estas entidades.

Los autores no manifiestan "conflictos de interés".

BIBLIOGRAFÍA

- Harris NL, Jaffe ES, Diebold J y col. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee Meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J.Clin Oncol.* 1999, 12:3835-3849.
- Horning SJ, Rosenberg SA. The natural history of initially untreated low-grade non-Hodgkin's Lymphomas. *N Engl J Med.* 1984, 311:1471-1475.
- Gallagher CJ, Gregory WM, Jones AE y col. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol.* 1986, 4:1470-1480.
- Akasaka T, Lossos IS, Levy R. BCL6 gene translocation in follicular lymphoma: a harbinger of eventual transformation to diffuse aggressive lymphoma. *Blood.* 2003, 102:1931-2.
- Chaganti RSK, Nanjangud G, Schmidt H y col. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: Biologic and clinical significance. *Sem. Hematol.* 2000, 37:396-411.
- Weiss LM, Warnke RA, Sklar J y col. Molecular analysis of the t(14;18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. *N. Engl. J. Med.* 1987, 317:1185-1189.
- Pezzella F, Ralfkiaer E, Gatter KC y col. The 14;18 translocation in European cases of follicular lymphoma: comparison of Southern blotting and the polymerase chain reaction. *Br. J Haematol.* 1990, 76:58-64.
- Cleary ML, Sklar J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosome breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82:7439-7441.
- Tsujimoto Y, Yunis J, Novell PC y col. Cloning of the chromosomal breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 1984, 226:1097-1099.
- Cleary ML, Smith SD, Sklar J. Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation. *Cell* 1986a, 47:19-28.
- Cleary ML, Sklar J, Galli N. Detection of a second t(14;18) cluster region in follicular lymphomas. *J Exp. Med.* 1986b, 164:315-320.
- Jäger U, Böcskör S, Le T y col. Follicular lymphomas BCL-2/IgH junctions contain templated nucleotide insertions: Novel insights into the mechanism of t(14;18) translocation. *Blood* 2000, 95:3520-3529.
- Meijerink JPP. t(14;18), a journey to eternity. *Leukemia* 1997, 11:2175-2187.
- Akasaka T, Muramatsu M, Ohno H y col. Application of long/distance polymerase chain reaction to detection of junctional sequences created by chromosomal translocation en mature B-cell neoplasma. *Blood* 1996, 88:985-994.
- Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N y col. Refinement of the BCL 2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. *Genes Chrom. Cancer* 1998, 21:17-19.
- Buchonnet G, Lenain P, Ruminy P y col. Characterization of BCL 2-JH rearrangements in follicular lymphoma: PCR detection of 3'BCL 2 breakpoints and evidence of a new cluster. *Leukemia* 2000, 14:1563-1569.
- Shih LY, Liang DC. Non-Hodgkin's lymphomas in Asia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991, 5:983-1001.
- Kim CW, Kim I, Ko YH y col. Clinicopathological and immunophenotypic study of non-Hodgkin's lymphoma in Korea: Lymphoreticular Study Group of the Korean Society of Pathologists. *J Korean Med Sci* 1992, 7:193-198.
- Parkin D, Whelan S, Ferlay J y col. Cancer incidence in five continents, Volume VII. IARC Scientific Publication N° 143, Lyon, France 1997.
- Anderson JR, Armitage JO, Weisenburger DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the

- major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann. Oncol.* 1998, 9:717-720.
21. Ko YH, Kim CW, Park CS y col. REAL classification of malignant lymphomas in the Republic of Korea: incidence of recently recognized entities and changes in Clinicopathologic features: Hematolymphoreticular Study Group of the Korean Society of Pathologists: revised European-American lymphoma. *Cancer* 1998, 83:806-812.
 22. Sukpanichnant S, Sonakul D, Pankijagum A y col. Malignant lymphoma in Thailand: changes in the frequency of malignant lymphoma determined from a histopathologic and immunophenotypic analysis of 425 cases at Siriraj Hospital. *Cancer* 1998, 83:1197-1204.
 23. Chiu BC-H. Epidemiology of Non-Hodgkin's Lymphomas. In: Vose JM, Chiu BC-H, Cheson BD, Dancey J, Wright J. Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's Lymphoma. American Society of Hematology, Education Program Book 2002, 241-245.
 24. Biagi J and Seymour J. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood* 2002, 99:4265-4275.
 25. Mitani S, Aoki N, Mizutani S y col. BCL-2 gene rearrangement analysis of Japanese follicular lymphomas by polymerase chain reaction in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *Jpn J Cancer Res* 1993, 84:37-41.
 26. Gribben JG, Freedman AS, Woo SD y col. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood* 1991, 78:3275-3280.
 27. Ortega V, Verastegui E, Flores G y col. Non-Hodgkin's lymphomas in Mexico. A clinicopathological and molecular analysis. *Leuk Lymphoma* 1998, 31:575-582.
 28. Leone PE, Perez JC, Morillo SA, Paz y Miño C. Low incidence of follicular lymphoma and t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction analysis. Observations on Ecuadorian patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2002, 137:72-74.
 29. Noriega MF, De Brasi C, Narbaitz M, Slavutsky I. Incidence of BCL-2 gene rearrangements in Argentinean non-Hodgkin lymphoma patients: increased frequency of breakpoints outside of MBR and MCR. *Blood Cells Mol Dis.* 2004, 32:232-9.
 30. Zelenetz AD, Chu G, Galili N y col. Enhanced detection of the t(14,18) translocation in malignant lymphoma using pulsed-field gel electrophoresis. *Blood* 1991, 78:1552-1560.
 31. Liu J, Johnson RM, Traweek ST. Rearrangement of the BCL-2 gene in follicular lymphoma: detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. *Diagn Mol Pathol* 1993, 2:241-247.
 32. Guillely ML, Dent GA, Ross DW. Classification and staging of lymphoma by molecular genetics. *Cancer* 1992, 69:1600-1606.
 33. López-Guillermo A, Cabanillas F, Mc Donnell TI y col. Correlation of bcl-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 1999, 93:3081-3087.
 34. Montoto S, López-Guillermo A, Colomer D y col. Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangement in follicular lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 2003, 44:71-76.
 35. Benítez J, Robledo M, Santon A y col. Correlation between cytogenetics and molecular analysis of t(14,18) in follicular lymphomas. *Cancer Genet Cytogenet* 1992, 59:68-72.
 36. Seité P, Hillion J, D'Agay MF y col. BCL2 gene activation and protein expression in follicular lymphoma: a report on 64 cases. *Leukemia* 1993, 7:410-417.
 37. Lee KA, Goepel JR, Winfield DA y col. Investigation of BCL-2 gene rearrangements in a United Kingdom series of low and high grade non-Hodgkin's lymphomas: *Leuk Lymphoma* 1993, 11:91-98.
 38. Lamberchts AC, Hupkes PE, Dorssers LC y col. Translocation (14;18)-positive cells are present in the circulation of the majority of patients with localized (stage I and II) follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1993, 82:2510-2516.
 39. Poetsch M, Weber-Matthiesen K, Plendl HJ y col. Detection of the t(14;18) chromosomal translocation by interphase cytogenetics with yeast-artificial-chromosome probes in follicular lymphoma and nonneoplastic lymphoproliferation. *J Clin Oncol* 1996, 14:963-969.
 40. Johnson A, Brun A, Dictor M y col. Incidence and prognostic significance of t(14;18) translocation in follicle center cell lymphoma of low and high grade: a report from southern Sweden. *Ann Oncol* 1995, 6:789-794.
 41. Albinger-Hegyí A, Hochreutener B, Abdou M-T y col. High frequency of t(14;18)-translocation breakpoints outside of major breakpoint and minor cluster regions in follicular lymphomas. Improved polymerase chain reaction protocols for their detection. *Am J Pathol* 2002, 160:823-832.
 42. Loke SL, Pittaluga S, Srivastava G y col. Translocation of bcl-2 gene in non-Hodgkin's lymphomas in Hong Kong Chinese. *Br J Haematol* 1990, 76:65-69.
 43. Chen PM, Lin SH, Seto M y col. Rearrangement of bcl-2 genes in malignant lymphomas in Chinese patients. *Cancer* 1993, 72:3701-3705.
 44. Peh SC, Shaminie J, Tai YC y col. The pattern and frequency of t(14;18) translocation and immunophenotype in Asian follicular lymphoma. *Histopathology* 2004, 45:501-10.
 45. Jacobson JO, Wilkes BM, Kwiatkowski DJ y col. Bcl-2 rearrangements in de novo diffuse large cell lymphoma. Association with distinctive clinical features. *Cancer* 1993, 72:231-236.
 46. Gascoyne RD, Adomat SA, Krejowski S y col. Prognostic significance of Bcl-2 protein expression and Bcl-2 gene rearrangement in diffuse aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Blood* 1997, 90:244-251.
 47. Volpe G, Vitolo U, Carbone A y col. Molecular heterogeneity of B-lineage diffuse large cell lymphoma. *Genes Chrom Cancer* 1996, 16:21-30.
 48. Intragumtornchai T, Wannakrairoj P, Chaimongkol B y col. Non-Hodgkin's lymphomas in Thailand: a retrospective pathologic and clinical analysis of 1391 cases. *Cancer* 1996, 78:1813-1819.
 49. Obafunwa JO, Akinsete I. Malignant lymphomas in Jos, Nigeria: a ten-year study. *Centr Afr J Med* 1992, 38:17-25.
 50. Walter PR, Klotz F, Alfry-Gattas T y col. Malignant lymphomas in Gabon (equatorial Africa): a morphologic study of 72 cases. *Hum Pathol* 1991, 22:1040-1043.
 51. Alizadeh AA, Elsen MB, Davis RE y col. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 2000, 403:503-511.
 52. Rosenwald A, Wright G, Chan WC y col. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 2002, 346:1937-47.

53. Huang JZ, Sanger WG, Greiner TC y col. The t(14;18) defines a unique subset of diffuse large B-cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profiles. *Blood* 2002, 99:2285-2290.
54. Lossos I, Alizadeh AA, Diehn M y col. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: Alternative patterns of c-myc and its regulates genes. *PNAS* 2002, 99:8886-8891.
55. Buchonnet G, Jardin F, Jean N y col. Distribution of BCL-2 breakpoints in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease *Leukemia* 2002, 16:1852-1856.
56. Montoto S, López-Guillermo A, Colomer D y col. Incidence and clinical significance of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphoma. *Leuk Lymphoma* 2003, 44:71-76.
57. Colleoni GW, Duarte LC, Kerbauy FR y col. Correlation between histological subtype and type of bcl-2/IgH rearrangements in follicular lymphomas. *Leuk Lymphoma* 2004, 45:331-338.

ACHADOS ULTRA-SONOGRÁFICOS NO DIAGNÓSTICO E EVOLUÇÃO DA APENDICITE AGUDA



Columnista Experto de SIIC
Dr. Arquimedes Artur Zorzetto

Médico Radiologista. Campo de especialização Radiologia Geral e Ultra-sonografia, Curitiba, Paraná, Brasil

Introdução

A apendicite aguda é a causa mais comum de abdome agudo e de cirurgia abdominal de emergência. Embora muitos pacientes apresentem quadro inicial clássico, alguns têm manifestações atípicas que dificultam o diagnóstico, particularmente as gestantes e as crianças.¹ Isso faz com que aproximadamente 35% dos casos de apendicite apresentem-se em fase adiantada no momento da cirurgia, já com perfuração e abscesso local.² Da mesma forma, aproximadamente 16% a 47% dos casos de laparotomia de emergência em um hospital geral são negativas, ou seja, acarretam a remoção de apêndices normais.³ A ultra-sonografia tem assumido um papel de destaque na avaliação inicial dos pacientes com abdome agudo, tendo em consideração a facilidade de acesso, baixo custo, imagem em tempo real e ausência de necessidade de preparo especial.⁴ Desde as primeiras descrições realizadas por Puylaert e cols., usando transdutores de alta frequência e compressão gradual, vários estudos têm relatado uma sensibilidade de 68% a 96%, especificidade de 91% a 100%, valor preditivo positivo de 89% a 96% e valor preditivo negativo de 76% a 96%, demonstrando ser a ultra-sonografia um excelente método diagnóstico nos casos de apendicite aguda e de suas complicações.⁴⁻¹⁰ Este estudo propôs-se a demonstrar os principais achados de ultra-sonografia nas diversas fases da apendicite, com o objetivo de auxiliar o radiologista no diagnóstico precoce desta afecção, além de correlacionar com o estudo de radiografias simples do abdome e tomografia computadorizada.

Materiais e métodos

São relatados 20 casos de ultra-sonografias abdominais realizadas no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2004, em pacientes provenientes do Pronto Atendimento do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e na Clínica CEDIP, que se apresentavam com quadro de dor abdominal difusa ou localizada na fossa ílica direita e hemograma infeccioso. O exame foi realizado inicialmente com transdutores convexos de 3.5 MHz e complementado com transdutores lineares de 7.5-10 MHz e com Doppler colorido. A compressão gradual foi realizada a fim de deslocar as alças intestinais e reduzir a distancia entre o processo inflamatório e o transdutor de alta frequência. Após a realização da ultra-sonografia, os achados eram correlacionados com outros exames de imagem (radiografia simples de abdome e tomografia computadorizada), quando disponíveis.

Resultados

O estudo ultra-sonográfico demonstrou, nas fases iniciais, apêndice com diâmetro aumentado (76%) (Figura 1), não compressível (73%) (Figura 2), paredes espessadas (53%) (Figura 3), com

calcificações no interior (apendicolito) (37%) (Figura 4), além de perda focal da definição das paredes (23%) (Figuras 5 e 6) e pequena quantidade de líquido ao redor (47%) (Figuras 7 e 8). Notou-se também aumento do fluxo na parede apendicular ao estudo por Doppler colorido (Figuras 9 e 10). Em casos mais avançados, observaram-se formação de plastrão (15%) (Figuras 11 e 12), liquefação (7%) (Figuras 13) e formação de abscesso (5%) (Figuras 14, 15 e 16), além de ar dentro da coleção (1%) (Figura 17). Observou-se, ainda, apêndice complicado em gestante de 23 semanas (18), em uma criança com um ano e meio de idade (Figura 19) e em um caso na região retrocecal (Figura 20).

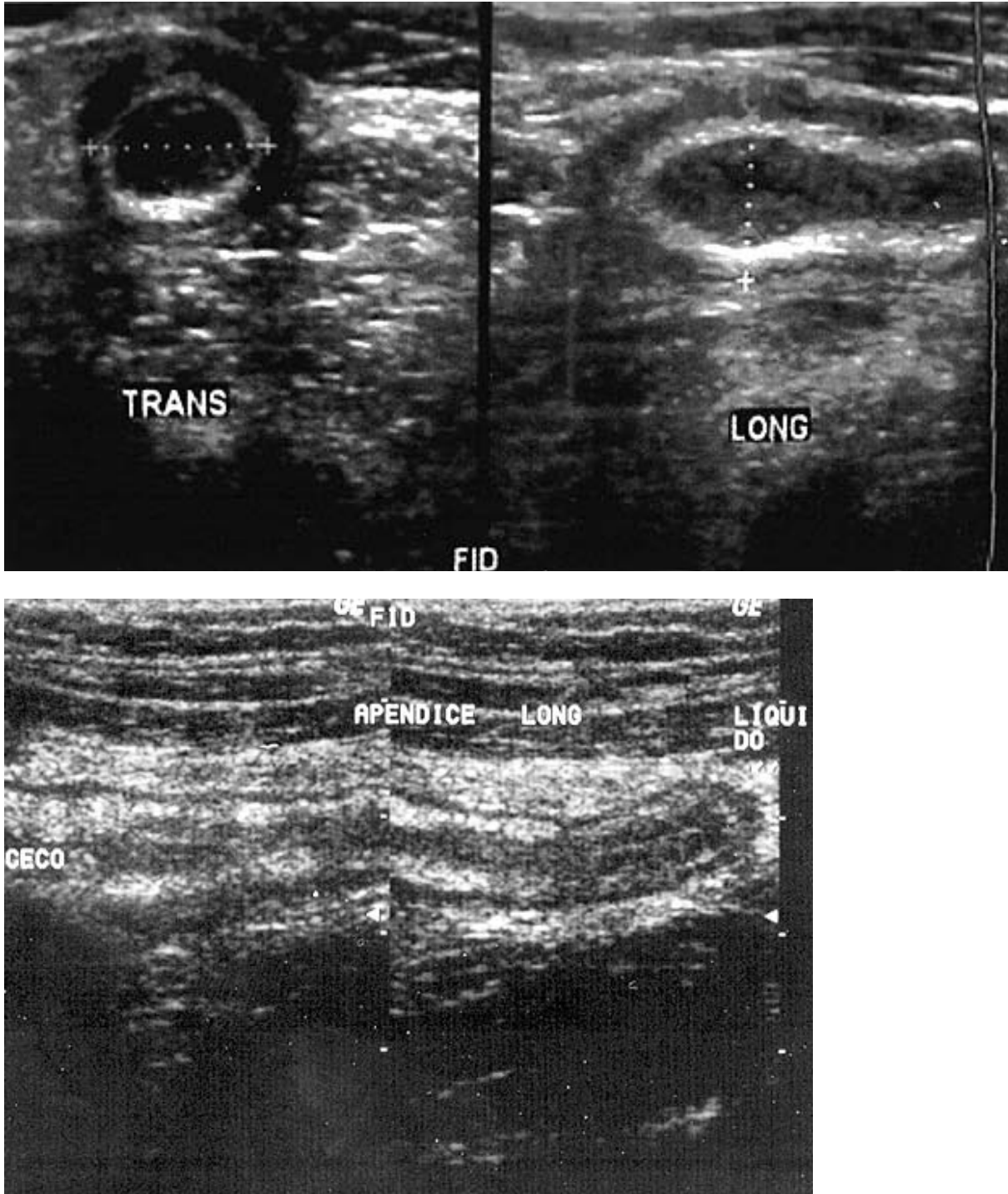


Figura 1. Paciente do sexo masculino, 30 anos de idade. Imagem tubular na fossa ilíaca direita, com 10 mm de diâmetro transversal (A e B), não compressível.

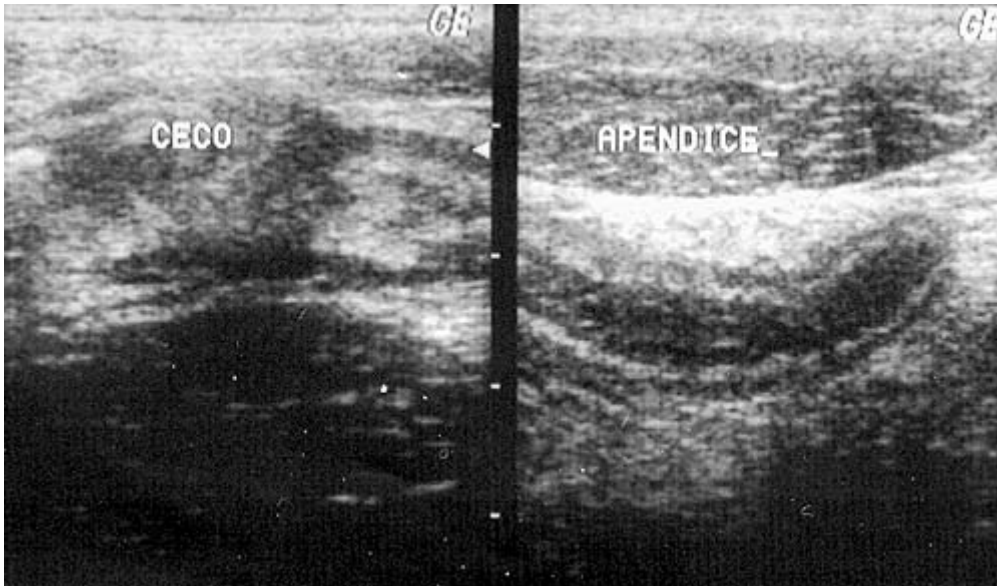


Figura 2. Paciente do sexo masculino, 32 anos de idade. Apêndice medindo 8 mm, sem mudança na conformação após compressão localizada.

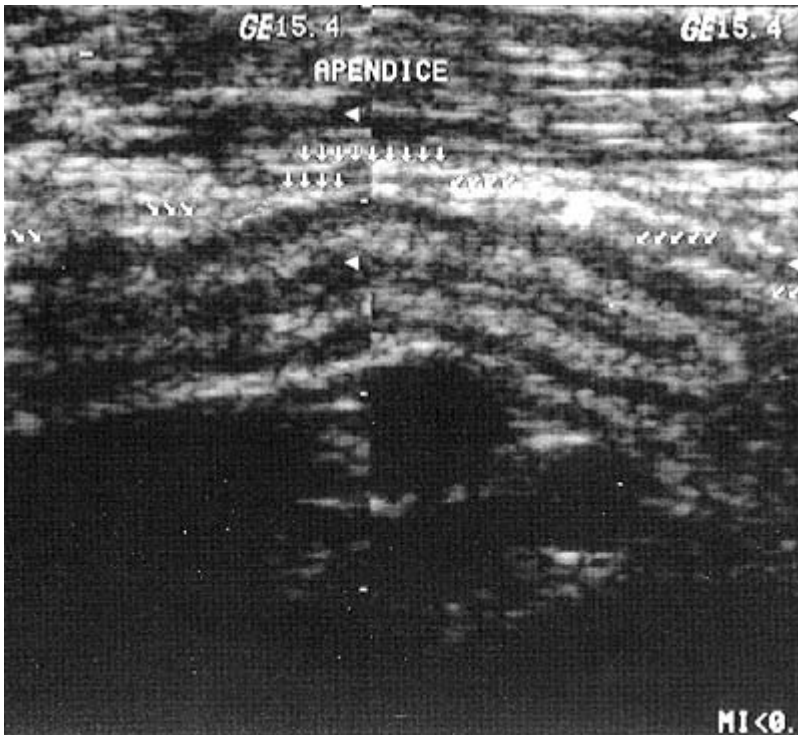


Figura 3. Paciente do sexo masculino, 38 anos de idade. Apêndice com paredes espessadas (4 mm) e perda da estratificação habitual.

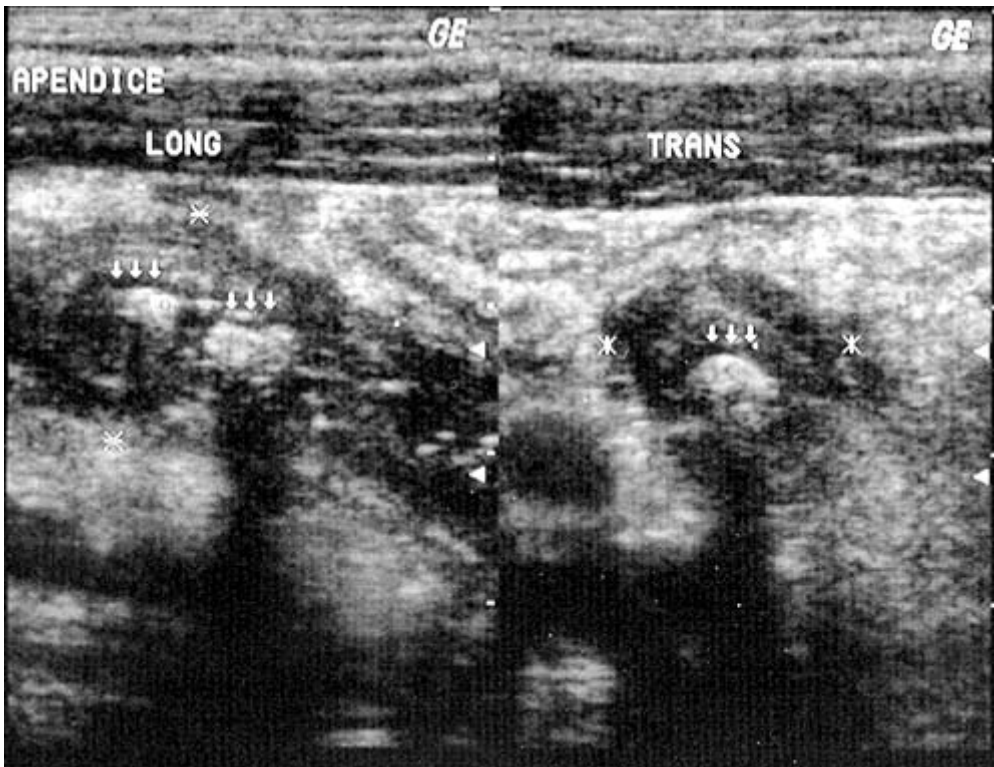


Figura 4. Paciente do sexo masculino, 16 anos de idade. Apêndice com imagem ecogênica com sombra acústica no interior (apendicolito), além de líquido ao redor.



Figura 5. Paciente do sexo feminino, 24 anos de idade. Imagem tubuliforme, com paredes espessadas e perda da definição na porção proximal, sugestivo de perfuração.

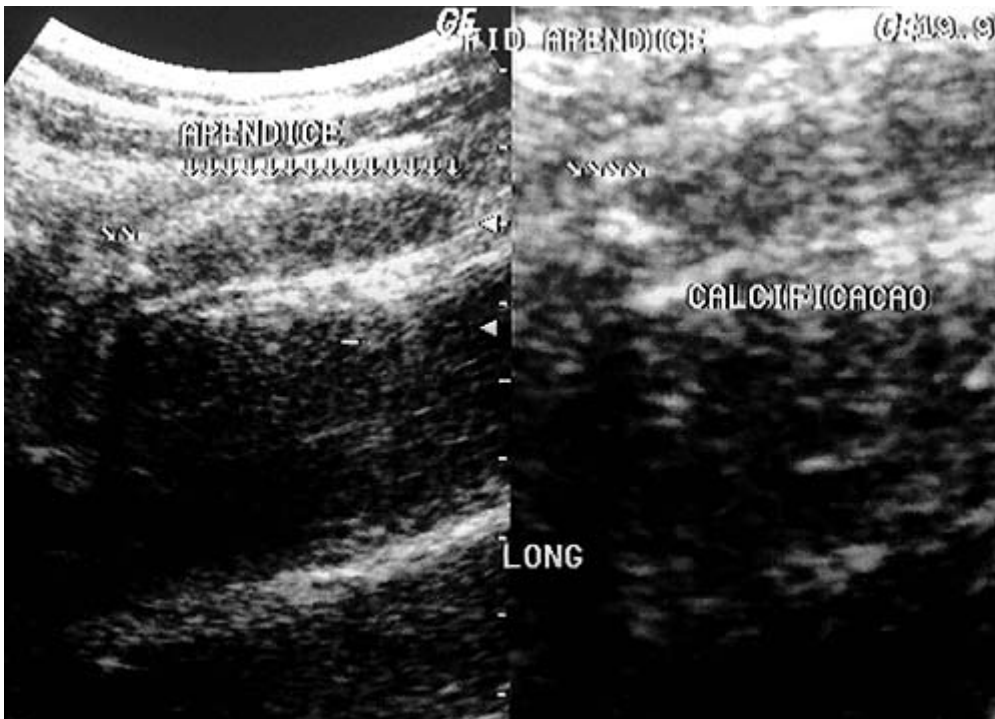


Figura 6. Paciente do sexo masculino, 37 anos de idade. Radiografia simples de abdome não demonstra alterações (A). A ultrasonografia demonstra apêndice de diâmetro aumentado, não compressível, paredes espessadas, com imagem de calcificação no seu interior (apendicolito) (B).

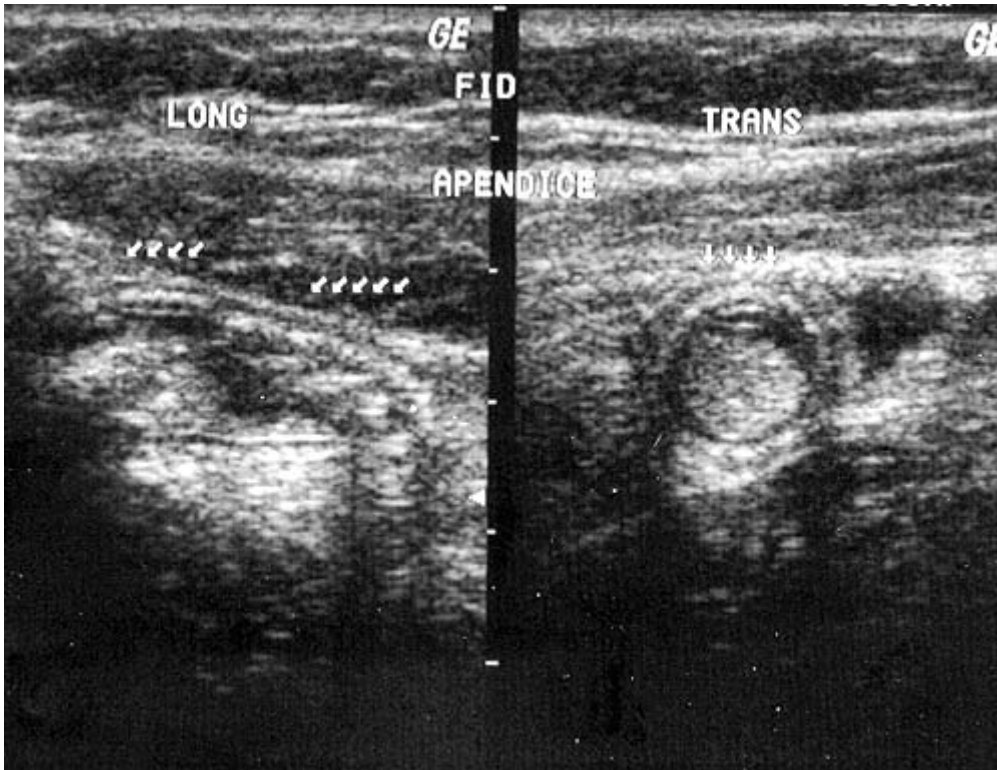
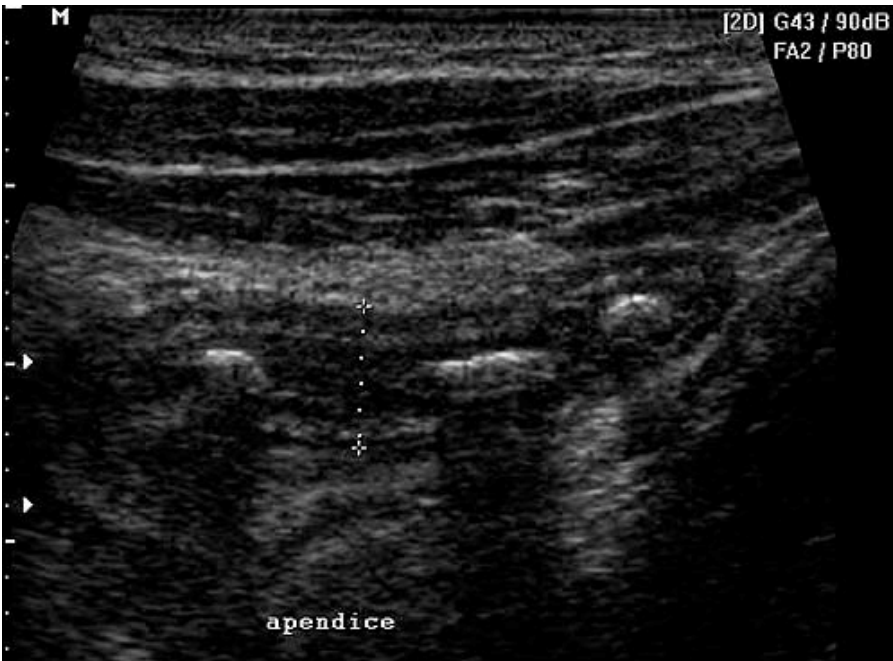


Figura 7. Paciente do sexo masculino, 32 anos de idade. Apêndice de calibre aumentado (13 mm), com conteúdo dismórfico no interior e pequena coleção líquida adjacente.



Figura 8. Paciente do sexo masculino, 28 anos de idade. Apêndice com diâmetro aumentado, paredes espessadas e pequena quantidade de líquido ao redor.



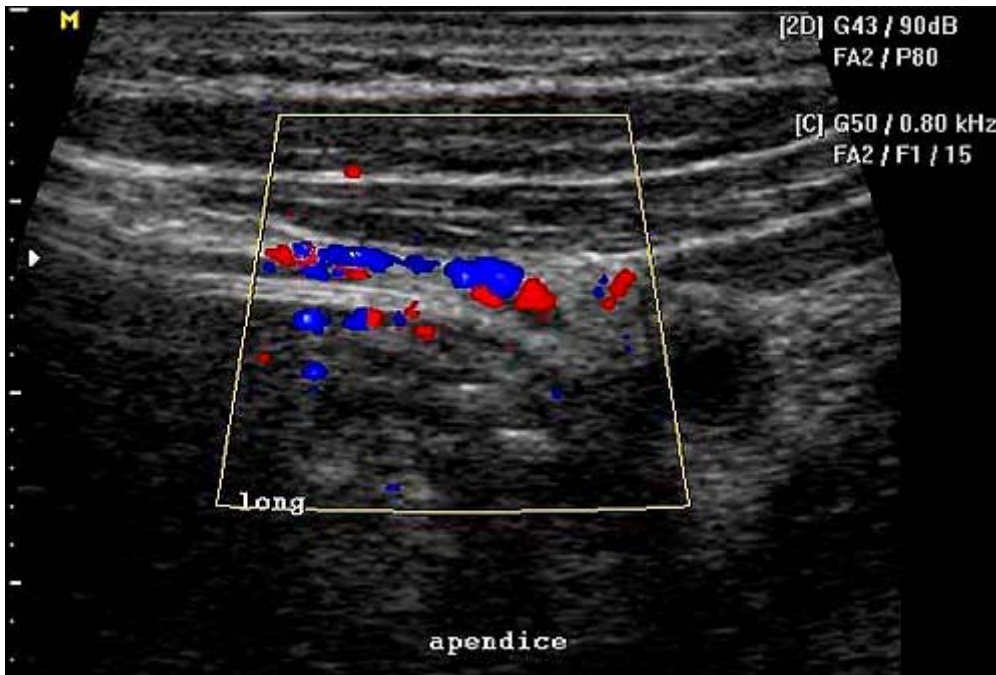


Figura 9. Paciente do sexo feminino, 19 anos de idade. Radiografia simples do abdome demonstra efeito de massa e borramento da linha de gordura na fossa ilíaca direita (A). A ultra-sonografia mostra apêndice com diâmetro aumentado, paredes espessadas, não compressível, apresentando calcificações no seu interior (apendicolitos) (B). O estudo com doppler colorido demonstra aumento do fluxo na parede apendicular (C).



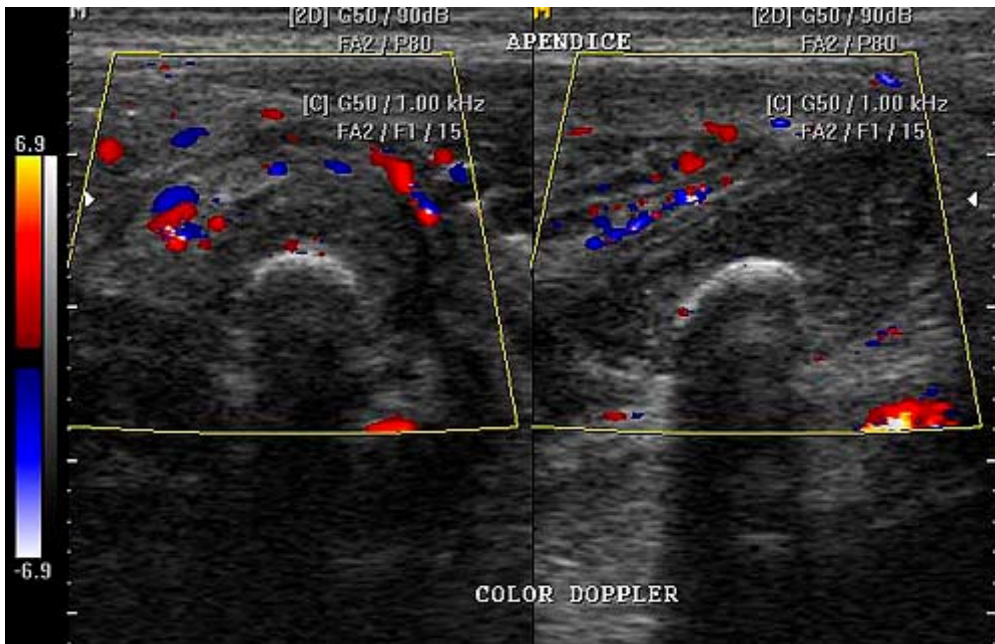


Figura 10. Paciente do sexo masculino, 18 anos de idade. Radiografia simples do abdome demonstra discreta escoliose anti-álgebra (A). O apêndice apresenta calibre aumentado e imagem calcificada no interior (apendicolito) (B). O estudo com Doppler colorido demonstra aumento do fluxo na parede apendicular (C). A tomografia computadorizada demonstra apêndice com paredes espessadas e diâmetro aumentado, contendo calcificação no interior (apendicolito), além de obliteração da gordura peri-apendicular (D).

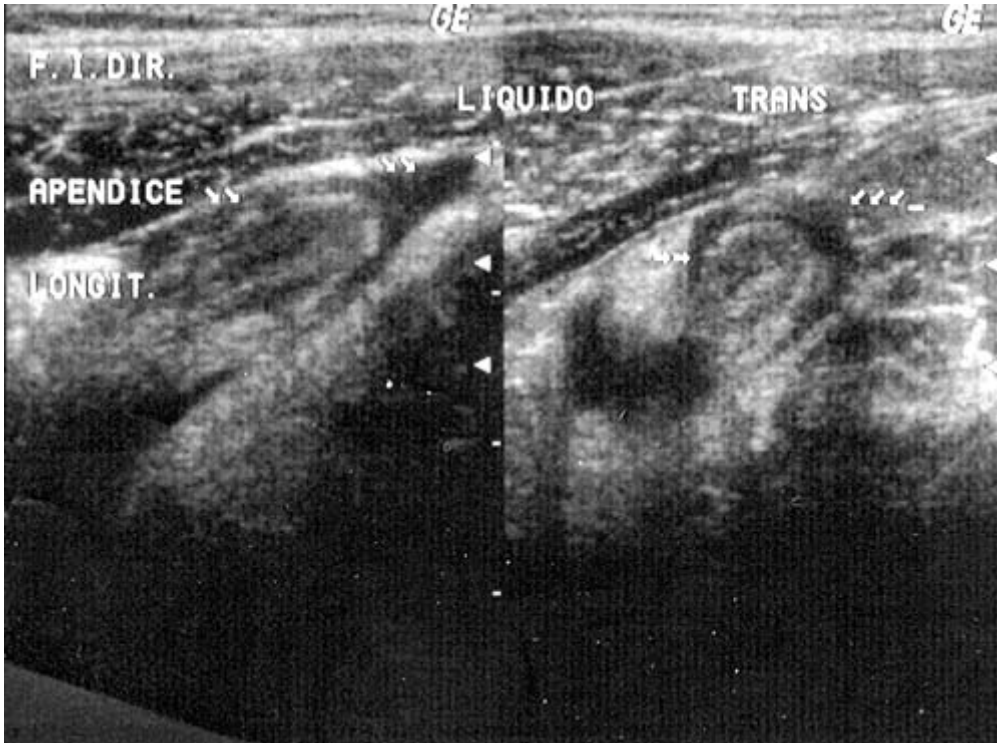
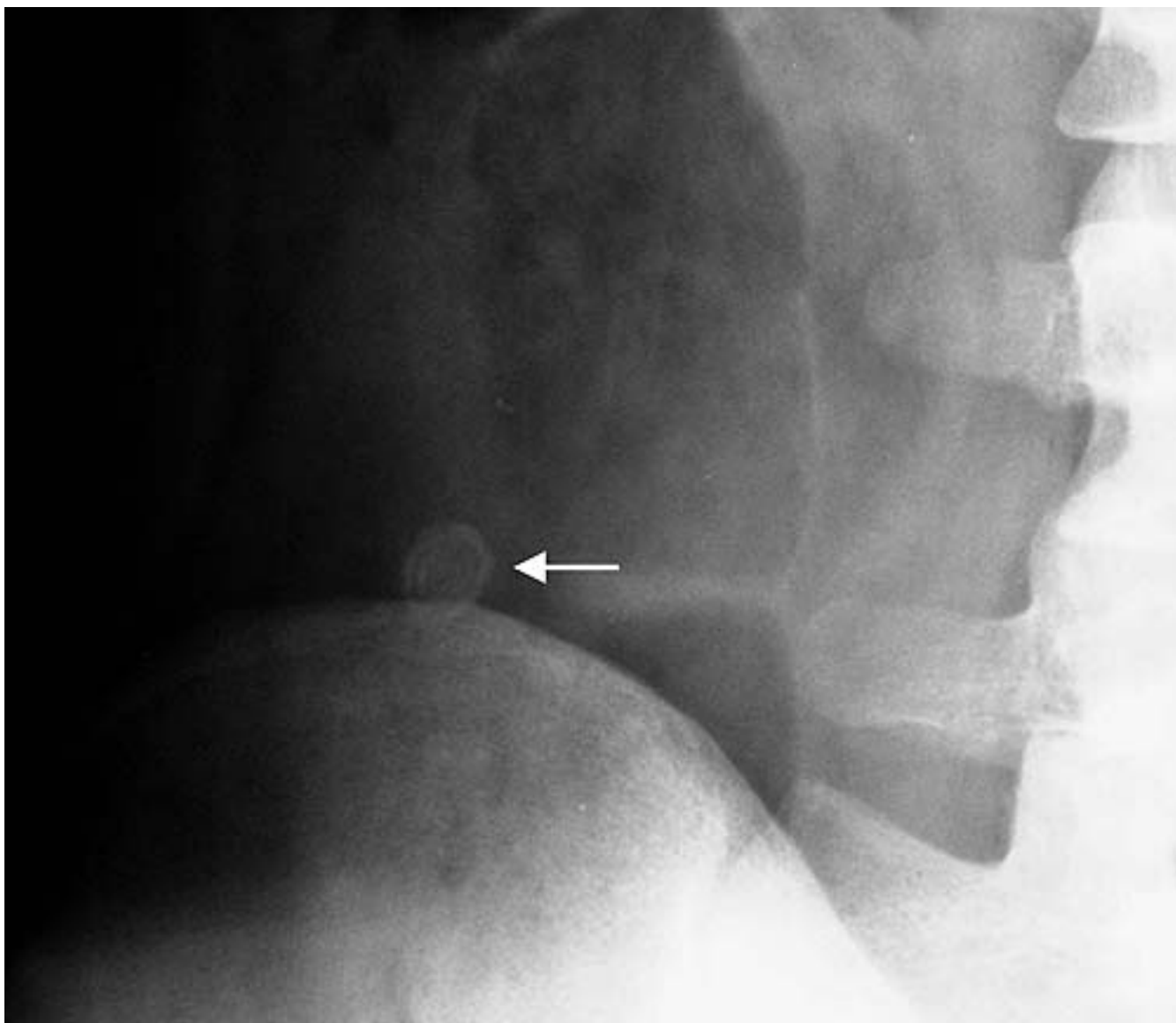


Figura 11. Paciente do sexo masculino, 23 anos de idade. Observa-se pequena quantidade de líquido ao redor do apêndice.



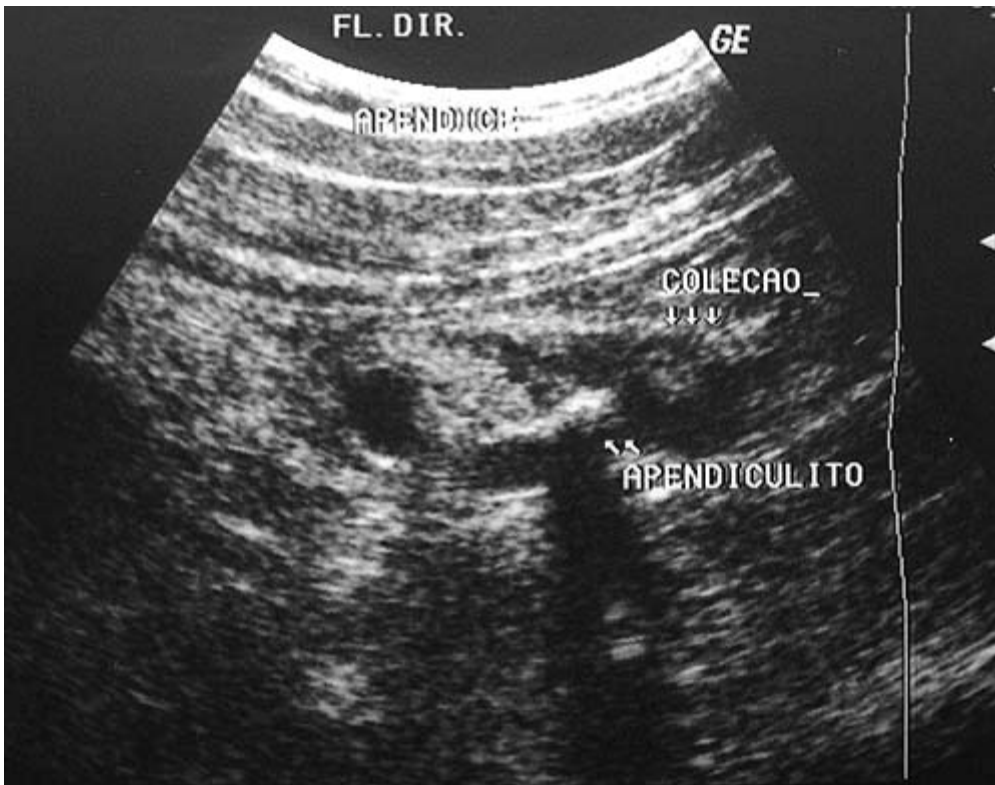


Figura 12. Paciente do sexo masculino, 21anos de idade. Radiografia simples do abdome demonstra calcificação arredondada (apendicolito) situada junto ao bordo superior da asa do osso íliaco em topografia do flanco direito (A). A ultra-sonografia mostra coleção líquida, heterogênea, situada anteriormente ao músculo psoas, com imagem de calcificação inclusa (plastrão com imagem de apendicolito).

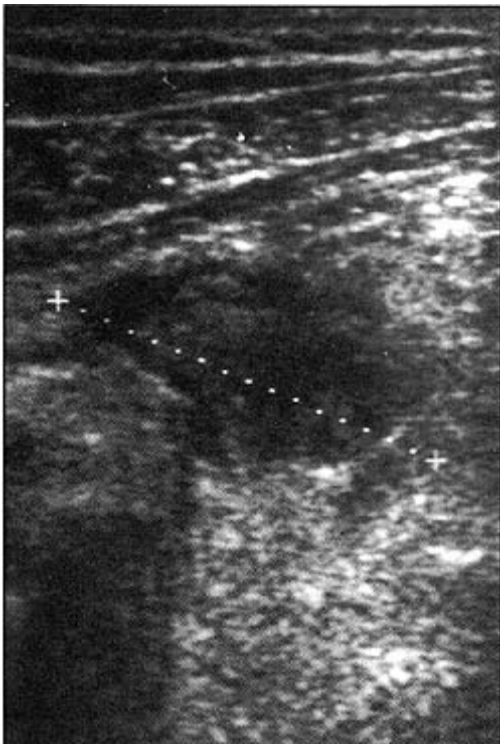


Figura 13. Paciente do sexo masculino, 44 anos de idade. Imagem hipocóica e mal delimitada na fossa íliaca direita, medindo aproximadamente 3 cm no maior diâmetro.

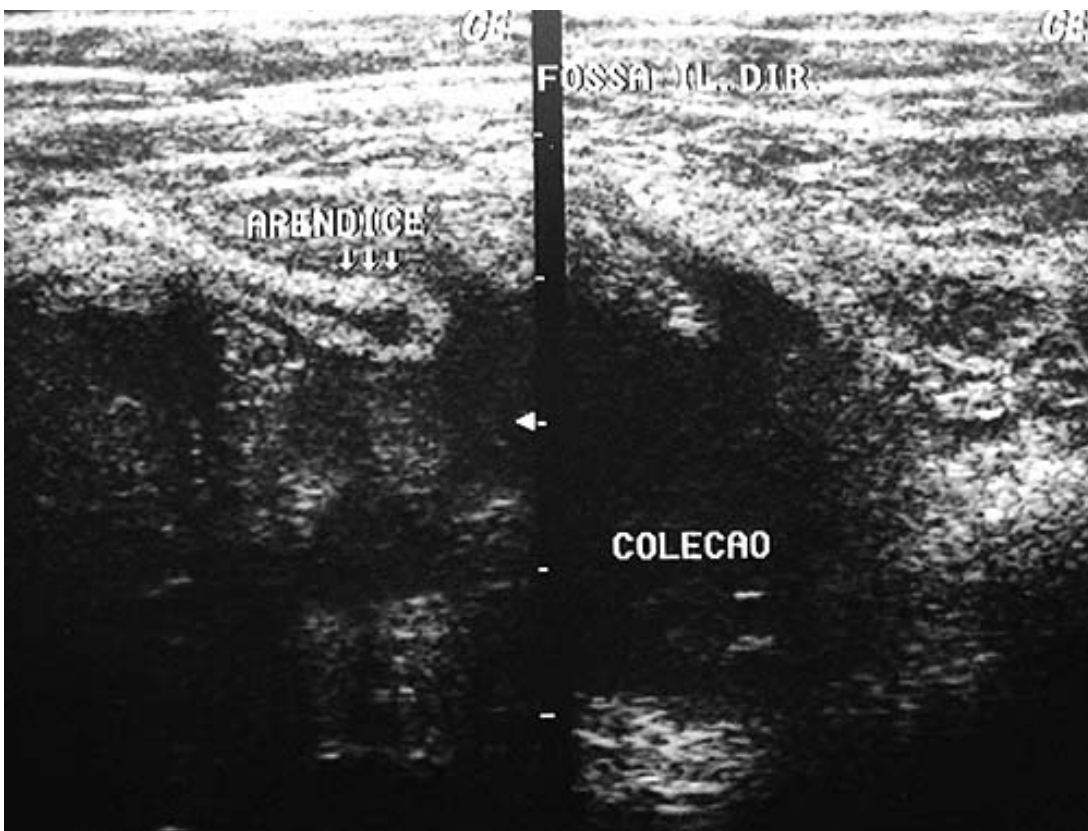


Figura 14. Paciente do sexo feminino, 41anos de idade. Radiografia simples do abdome mostra escoliose anti-álgica e efeito de massa com borramento da linha de gordura em fossa ilíaca direita (A). A ultra-sonografia demonstra apêndice de calibre aumentado, paredes espessadas, não compressível e grande coleção líquida ao redor (abcesso) (B).

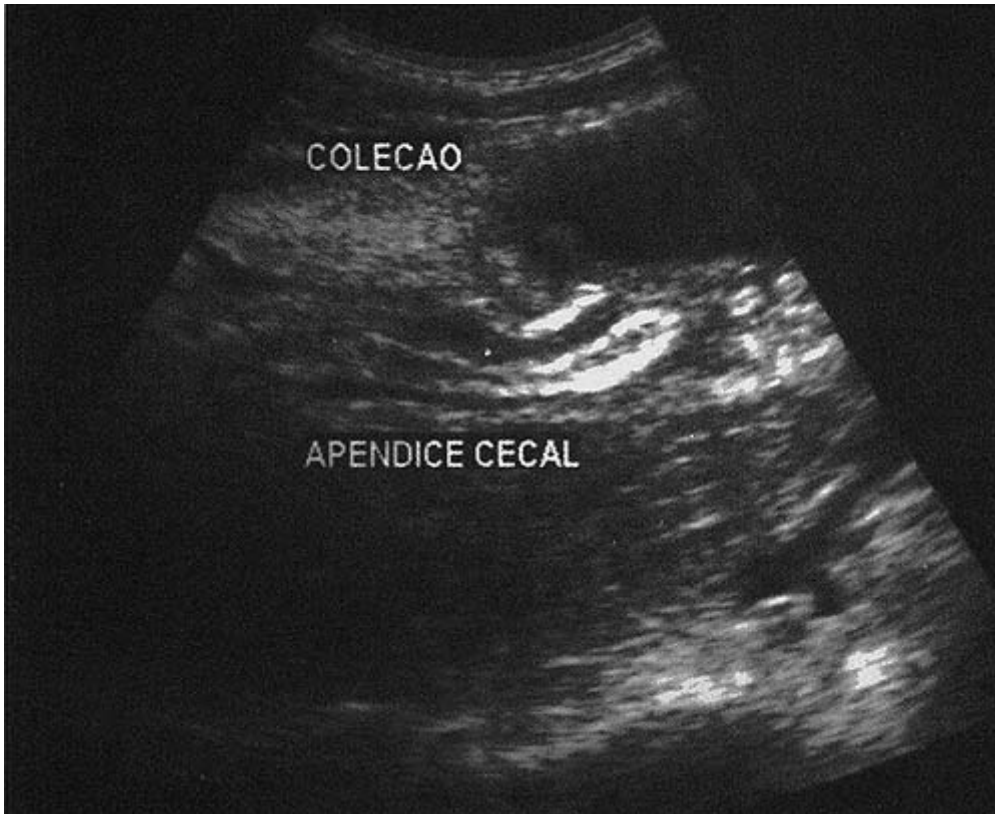


Figura 15. Paciente do sexo masculino, 27 anos de idade. Observa-se coleção hipocóica, mal delimitada na fossa íliaca direita, adjacente à porção terminal do apêndice.

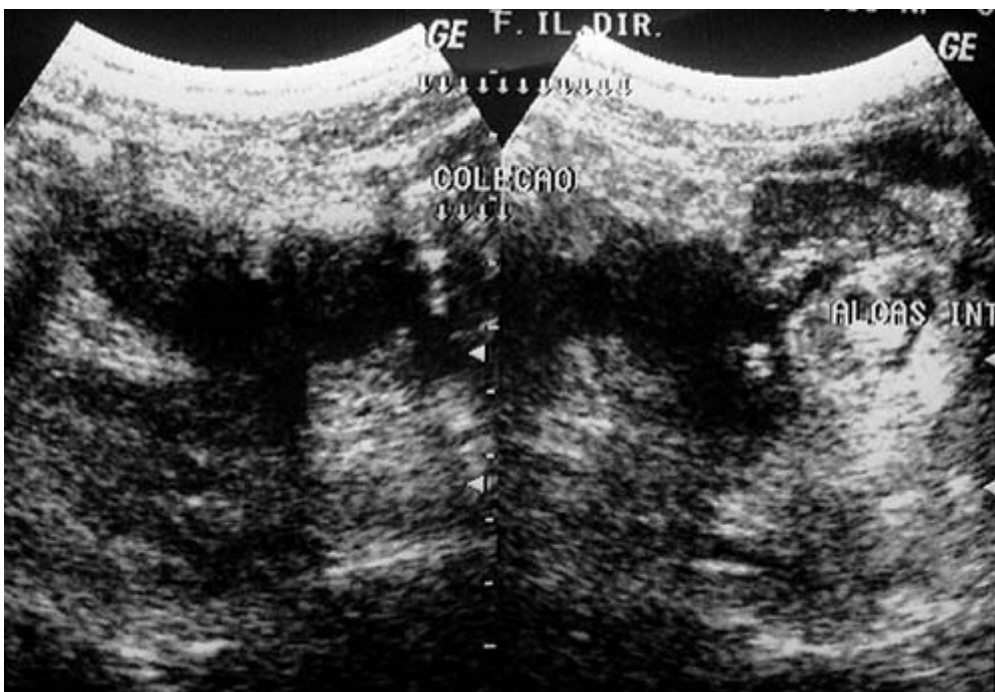


Figura 16. Paciente do sexo feminino, 31 anos de idade. Volumosa coleção líquida heterogênea, de limites mal definidos, situada na fossa íliaca direita (plastrão).



Figura 17. Paciente do sexo feminino, 36 anos de idade. Nota-se na fossa ilíaca direita, coleção hipocóica, mal delimitada, com áreas ecogênicas no interior, compatível com ar fora da alça intestinal.



Figura 18. Gestante de 18 semanas, com 19 anos de idade, apresentando há uma semana dor de leve intensidade na fossa ilíaca direita. Observa-se adjacente ao útero, coleção hipocóica, mal delimitada, com ar no interior, medindo aproximadamente 4 cm no maior diâmetro.

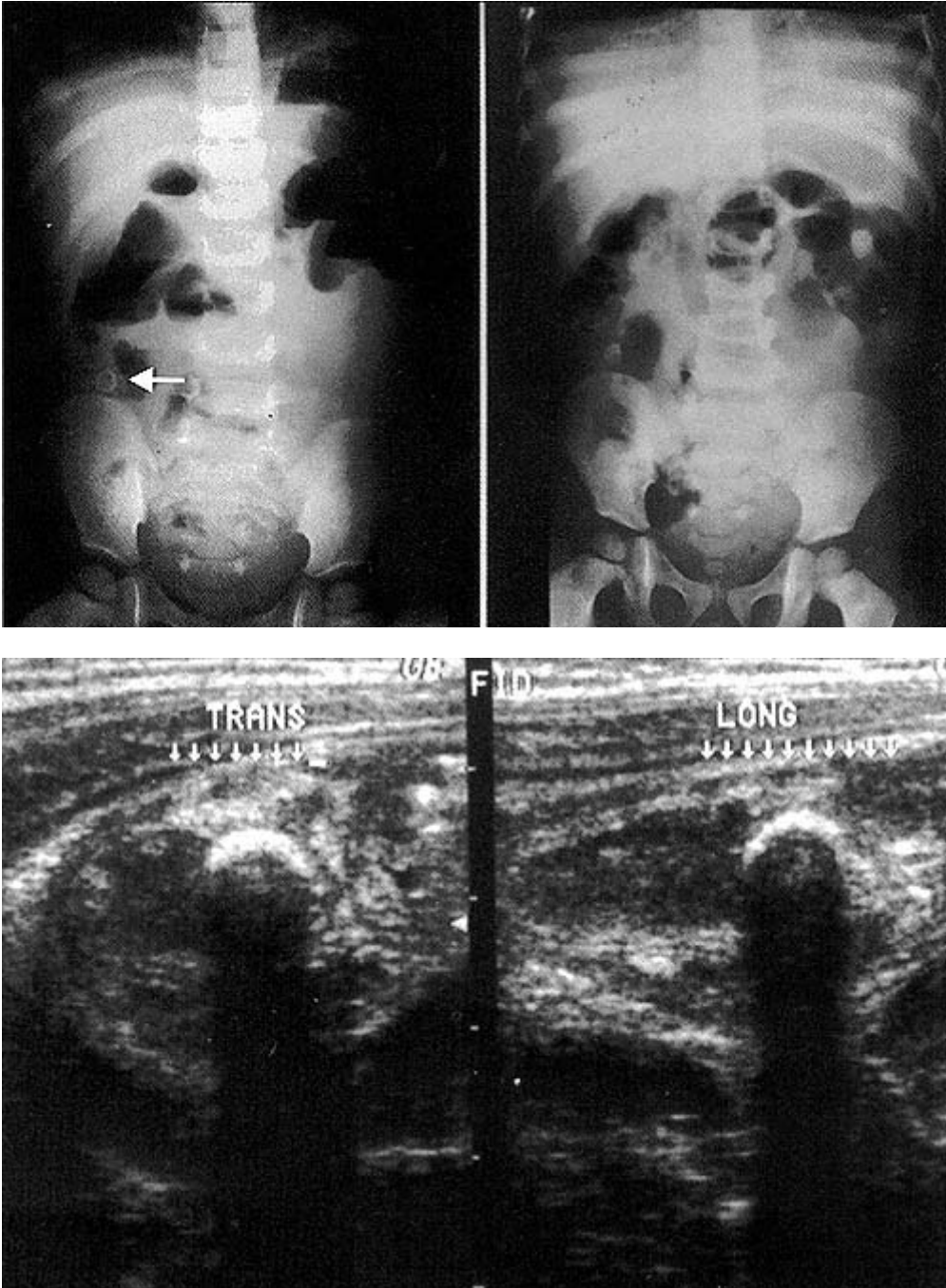


Figura 19. Criança com um ano de idade, apresentando dor abdominal há 12 horas. A radiografia simples demonstra imagem densa e arredondada na fossa ilíaca direita, compatível com apendicolito (A). Foi complementado o estudo com ultra-sonografia, que demonstrou imagem tubuliforme, com apendicolito no interior e líquido ao redor, compatível com apendicite perforada (B).

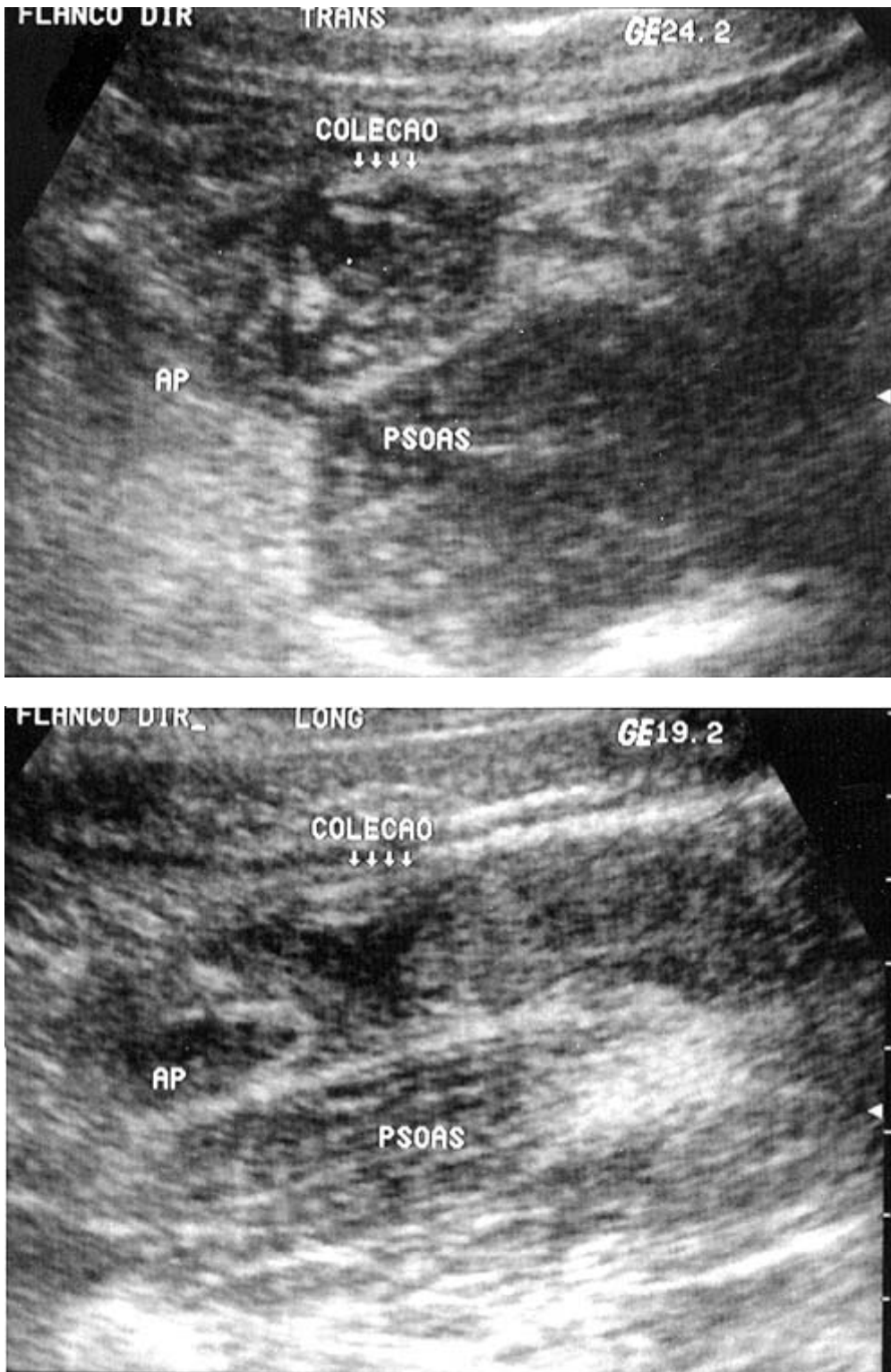


Figura 20. Paciente do sexo masculino, 24 anos de idade. Observa-se coleção hipocóica, mal delimitada, localizada sobre o músculo iliopsoas à direita (A), compatível com apêndice retrocecal (B).

Discussão

A incidência máxima da apendicite ocorre na 2^o e 3^o décadas de vida (raramente nos extremos de idade), sendo os homens mais afetados que as mulheres (3:2). A perfuração e a mortalidade são mais frequentes em lactantes e idosos. A localização anatômica variável do apêndice contribui para uma multiplicidade de apresentações clínicas da apendicite, que são atípicas em até 30% dos casos.^{9,11-13} O apêndice vermiforme normal é de difícil identificação. A sua localização depende da

visualização seqüencial do íleo terminal, válvula íleo cecal e polo cecal. O ceco determinará a posição correta do apêndice, que pode ser alta, baixa ou em região pélvica. Uma vez identificado o apêndice, o mesmo deve ser correlacionado com o ponto máximo de dor referido pelo paciente, a fim de confirmar se o mesmo é a causa da dor (sinal de McBurney ecográfico).⁴ O apêndice é habitualmente visualizado na ultra-sonografia como um órgão tubular, compressível, preenchido por fezes ou gás, com diâmetro menor que 6 mm e paredes estratificadas menores que 3 mm.¹ Nos casos onde é possível a identificação do apêndice normal, este se torna o critério isolado mais importante na exclusão da apendicite aguda.^{4,8} A fisiopatologia da apendicite aguda inicia com a obstrução do lúmen apendicular, por material fecal ou apendicolito (visto em 35% dos casos).¹⁴⁻¹⁶ As secreções mucosas aumentam a pressão intraluminal e comprometem o retorno venoso. A mucosa torna-se hipóxica e apresenta ulcerações. Sobrevém infecção bacteriana, culminando, por fim, em gangrena e perfuração. Ocorre então peritonite livre, podendo ser vistas coleções na pelve, flanco, regiões sub-hepáticas e subdiafragmáticas à direita, porém mais comumente observa-se abscesso encapsulado ao redor do apêndice, devido a bloqueio do processo pelo mesentério e alças da região.¹⁷ O diagnóstico ultra-sonográfico da apendicite aguda depende do estágio anatomopatológico desta. Na apendicite aguda simples o órgão conserva sua forma, porém apresenta-se edemaciado em toda a sua extensão. Os principais achados ultra-sonográficos são: apêndice não compressível com diâmetro transversal maior que 6 mm, paredes com espessura maior que 3 mm, ausência da camada ecogênica central (submucosa), ausência de gás no interior do apêndice, sendo este preenchido por líquido, presença de apendicolito, visível como uma imagem ecogênica com sombra acústica, independentemente do tamanho apendicular.¹⁷ Nota-se também aumento do fluxo sanguíneo na parede do apêndice vermiforme através do estudo com Doppler colorido.⁴ Na fase da apendicite gangrenosa observa-se necrose localizada ou extensa da parede apendicular, às vezes com perfurações microscópicas. No exame por ultra-som podem ser observados espessamento irregular da parede do apêndice, pequenas coleções intraparietais, anecóicas ou ecogênicas, causadas por pequenos abscessos ou ar, ou ainda pequenas coleções periapendiculares.¹⁸ Nota-se também aumento da ecogenicidade da gordura periapendicular.⁴ Na fase de apendicite francamente perfurada ocorre rompimento da parede com extravasamento do conteúdo para a cavidade abdominal, muitas vezes com destruição total do apêndice. Nesta fase, a sensibilidade do ultra-som diminui, porque não se visualiza mais o apêndice, mas apenas as alterações adjacentes, como massa periapendicular, coleções intra-abdominais ou adenopatia mesentérica. Os abscessos, forma mais comum de apresentação da perfuração, podem apresentar-se de formas variadas, desde imagens anecóicas semelhantes a cistos, até imagens complexas, mal definidas, acompanhadas de sombra acústica causada pelo ar em cavidade. Podem simular alças intestinais, com diferenciação através da observação dos "movimentos brownianos", característicos de alças intestinais.¹⁹ As principais dificuldades e fontes de erros no diagnóstico da apendicite são: exames de qualidade técnica ruim ou com profissionais não habilitados; exames incompletos, que podem levar à falsa impressão de apêndice normal quando, na verdade, a inflamação está confinada à sua ponta; a posição do apêndice, particularmente quando é retrocecal; erro na identificação das estruturas, como a visualização do íleo terminal como o apêndice; tipo de paciente, principalmente os obesos e com distensão abdominal, onde o transdutor de alta frequência pode falhar na visualização das estruturas profundas do abdome, podendo levar a um diagnóstico falso-negativo.^{4,9,13,20} Algumas manobras tem sido descritas a fim de auxiliar na detecção da apendicite aguda. A compressão manual posterior ajuda a reduzir a distancia entre o apêndice e o ponto focal do transdutor, melhorando a visualização das estruturas nos casos de apêndices localizados na profundidade da cavidade.⁴ A posição de decúbito lateral oblíquo esquerdo auxilia a visualização do apêndice retrocecal. Nesta posição, o ceco e o íleo terminal são deslocados medialmente sobre o músculo psoas e a distancia até a região retroileal e subcecal é reduzida. Esta técnica pode ser particularmente útil nos casos de gestantes.⁴ Exames seriados também são recomendados, já que a apendicite é uma patologia dinâmica, que evolui num período de 24 a 36 horas.¹⁰ Nos casos onde o diagnóstico de apendicite é excluído, o ultra-sonografista deve procurar as patologias que podem mimetizar a clínica da apendicite aguda, como a diverticulite colônica direita, infarto omental direito, enterocolite aguda, doença de crhon, cálculo uretral, doença inflamatória pélvica e gravidez ectópica.^{4,8,10,21} Outros métodos de imagem podem auxiliar o diagnóstico da apendicite. O Raio-X pode auxiliar o diagnóstico, através da visualização de sinais indiretos, como borramento da gordura adjacente ao músculo psoas, escoliose anti-álgica e efeito de massa em região de fossa ilíaca direita. A visualização do apendiculito pode auxiliar o

diagnóstico, embora isso ocorra em 10-14% dos casos. Nos casos de radiografias normais, não é possível excluir a presença de apendicite aguda.¹¹ A tomografia computadorizada tem sido utilizada com bons resultados. Desde a descrição inicial por Rao e cols., vários estudos demonstram uma excelente acuracidade, com níveis de sensibilidade variando de 87-100% e especificidade de 91-97%.²² O grande dilema da tomografia é a dificuldade em demonstrar o apêndice normal. Mesmo em paciente sem evidências de inflamação na região íleo cecal, no qual o apêndice não é visualizado, existem chances de existir um processo de apendicite aguda inicial. Outro problema é o retardo no diagnóstico que ocorre nos pacientes que são submetidos à tomografia (11.9 horas), quando comparados com o grupo de pacientes que não são submetidos ao exame (6.5 horas). Outro inconveniente é a necessidade, em alguns casos, de contraste oral, retal ou endovenoso. Nos países subdesenvolvidos, também devemos levar em consideração o alto custo do exame. Dessa forma, a tomografia computadorizada poderia ser reservada para casos onde a ecografia tem sensibilidade reduzida ou não conseguiu definir o diagnóstico.^{4,8-10,12,13} Portanto, a ultrasonografia com compressão gradual freqüentemente oferece uma boa visualização do apêndice vermiforme, podendo ser usada como o método inicial de escolha devido a sua rapidez, baixo custo, disponibilidade, não invasividade e imagem em tempo real.

Los autores no manifiestan "conflictos de interés".

BIBLIOGRAFÍA

1. Puylaert JBCM. Acute appendicitis: US evaluation using graded compression. *Radiology* 1986;158:355-60.
2. Shaw RE. Appendix calculi and acute appendicitis. *Br J Surg* 1965;52:452-9.
3. Jeffrey RB Jr, Laing FC, Lewis FR. Acute appendicitis: high-resolution real-time US findings. *Radiology* 1987;163:11-4.
4. Lee JH: Sonography of acute appendicitis. *Sem US CT MRI* 2003; 24: 83-90.
5. Puylaert JBCM. Acute appendicitis: US evaluation using graded compression. *Radiology* 1986; 158:335-360.
6. Vigneault F, Filiatrault D, Brandt ML, et al. Acute appendicitis in children: evaluation with US. *Radiology* 1990; 176:501-504.
7. Sivit CJ. Diagnosis of acute appendicitis in children: spectrum of sonographic findings. *AJR* 1993; 161:147-152.
8. Lee SL, Ho HS. Ultrasonography and computed tomography in suspected acute appendicitis. *Sem US CT MRI* 2003; 24:69-73.
9. Sivit CJ, Applegate KE. Imaging of acute appendicitis in children. *Sem US CT MRI* 2003; 24:74-82.
10. Blebea JS, Meilstrup JW, Wise SW. Appendiceal imaging: which test is best *Sem US CT MRI* 2003; 24:91-95.
11. Mittelstaedt CA. Gastrointestinal tract. In: General ultrasound. Mittelstaedt CA. Editora ChurchillLivingstone, Edinburgh, 1º ed, 1992; pag 449-587.
12. D'Ippólito G, Mello GGN, Szejnfeld J et al. The value of unenhanced CT in the diagnosis of acute appendicitis. *Rev Paul Méd* 1998; 116:1839-1846.
13. Silva-Palacio GA, Bianco FD, Domenicis Jr O, D'Ippólito G. Aspectos tomográficos incomuns da apendicite aguda e suas complicações. *Rev Imagem* 2003; 25:269-275.
14. Dachman AH, Nichols JB, Patrick DH, Lichtenstein JE. Natural history of the obstructed rabbit appendix: observations with radiography, sonography, and computed tomography. *AJR* 1987; 148:281-284.
15. Jeffrey RB Jr, Laing FC, Townsend RR. Acute appendicitis: sonographic criteria based on 250 cases. *Radiology* 1988;167:327-329.
16. Abu-Yousef MM, Bleicher JJ, Maher JW, Urdaneta LF, Franken EA Jr, Metcalf AM. High-resolution sonography of acute appendicitis. *AJR* 1987;149:53-58.
17. Rioux M. Sonographic detection of the normal and abnormal appendix. *AJR* 1992;158:773-778.
18. Sheng PY. Apendicite aguda gangrenosa com abscesso. *Rev Imagem* 1986; 8:61-62.
19. Borushok KF, Jeffrey RB Jr, Laing FC, Townsend RR. Sonographic diagnosis of perforation in patients with acute appendicitis. *AJR* 1990; 154:275-278.
20. Lim HK, Lee WJ, Lee SJ, Namgung S, Lim JH. Focal appendicitis confined to the tip: diagnosis at US. *Radiology* 1996; 200:799-801.
21. BA, Wilson SR. Appendicitis at the millenium. *Radiology* 2000; 215:337-348.
22. Rao Pm, Rhea TJ, Rattner DW, et al. Introducion od appendiceal CT: Impact on negativee appendectomy and appendiceal perforations rates. *Ann Surg* 1999; 229:344-349.