

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Ambientais e Saúde

**AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS DOS GRÂNULOS DO PADRÃO  
NUCLEAR PONTILHADO GROSSO EM FAN HEP-2**

FLÁVIA IKEDA E ARAÚJO

Goiânia – Goiás  
Janeiro de 2005

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa  
Programa de Pós-Graduação (Mestrado) em Ciências Ambientais e Saúde

**AVALIAÇÃO DAS MEDIDAS DOS GRÂNULOS DO PADRÃO  
NUCLEAR PONTILHADO GROSSO EM FAN HEP-2**

FLÁVIA IKEDA E ARAÚJO

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> CLÁUDIA MARIA RASSI  
CO-ORIENTADOR: PROF. DR. EDUARDO SIMÕES DE ALBUQUERQUE

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde, da Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Saúde

Goiânia – Goiás  
Janeiro de 2005

Agradeço a Deus, por estar sempre me guiando com muito amor e cuidado em minha trajetória. Aos meus pais, Aparecido e Helena, pelo amor, dedicação e incentivo, foram eles que fizeram com que mais uma etapa da minha vida fosse alcançada. Ao meu irmão Thiago, pela amizade e apoio em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Profa. Dra. Cláudia Maria Rassi, pela valiosa orientação e disponibilidade constante para o desenvolvimento deste trabalho. Sou muito grata pela confiança depositada em mim e compreensão nos momentos de falha e desânimo.

Ao Prof. Dr. Eduardo Simões de Albuquerque, pelo auxílio, disponibilidade e grande contribuição para a realização do trabalho.

Ao Prof. Paulo Luiz Carvalho Francescantonio, pela total disponibilidade, incentivo e grande auxílio em todas as etapas do trabalho, pela confiança e amizade de sempre.

Ao Prof. Ms. Wilson de Melo Cruvinel, pela confiança e preocupação com meu crescimento profissional, e principalmente pela amizade verdadeira. Seus inúmeros conselhos foram essenciais.

Aos Profs. Drs. Nilzio Antônio da Silva e Wellington Santos Martins, pela participação na banca de qualificação e importantes sugestões para o presente trabalho.

Ao Prof. Ms. Paulo Roberto de Melo Reis, pelo apoio e confiança em mim depositados.

Ao Coordenador do Laboratório da Área de Saúde da Universidade Católica de Goiás, Biomédico Mauro Meira Mesquita, por permitir a utilização do laboratório e seus equipamentos.

Ao amigo Biomédico Douglas Araújo dos Santos Albernaz, pelo companheirismo e grande auxílio em todas as etapas do trabalho.

À Biomédica Eliane de Paiva e Silva, responsável pela seção de Imunologia do Laboratório da Área de Saúde - UCG, pela disponibilidade e auxílio na realização das técnicas empregadas no trabalho.

Aos amigos biomédicos Aline Aguiar de Araújo, Fabiana Nunes de Carvalho Guimarães, Hermínio Maurício da Rocha Sobrinho, Karla Carvalho Miranda, Paulo Marcelo de Faria Vasconcelos, Péricles Lopes Dourado e Shelly Lopes de Azambuja, pela presença constante em minha vida, conselhos e apoio nos momentos de angústia, desânimo e principalmente pela amizade sincera.

Aos bolsistas, monitores e estagiários do Laboratório de Apoio Didático da Universidade Católica de Goiás, Aurélio Goulart Rodovalho, Carolina Aguiar de Araújo, Caroline Steglich Ramos, Danilo Mesquita Júnior, Érika Moreno Camargo, Fábio Marques de Almeida, Fernando Vianna Cabral Pucci, Kássia Ferreira de Jesus, Luana Inácio Pereira, Rogério de Souza Negre, pela amizade, disponibilidade e comprometimento ao me auxiliar na realização deste trabalho.

A todos familiares, amigos, colegas e professores que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e acreditaram na minha capacidade e seriedade para o desenvolvimento deste, muito obrigada.

## RESUMO

Os anticorpos antinucleares, bastante heterogêneos quanto à sua especificidade antigênica, são de grande relevância clínica para o diagnóstico e a monitoração terapêutica em doenças reumáticas autoimunes. A técnica de imunofluorescência indireta (IFI) para pesquisa de auto-anticorpos antinucleares em células HEp-2 (FAN HEp-2) é um teste sensível e atualmente o de escolha para a triagem de uma grande variedade de auto-anticorpos. O padrão de imunofluorescência pode fornecer uma idéia preliminar dos possíveis auto-anticorpos envolvidos. Os padrões nucleares pontilhado grosso (relacionado aos anticorpos anti-Sm e anti-U1RNP) e pontilhado fino (envolvido com os anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La) são diferenciados apenas visualmente, pelo aspecto dos grânulos presentes no núcleo celular, podendo gerar dúvidas no observador e conseqüentemente, comprometer o diagnóstico clínico. Neste trabalho, foram realizadas medidas dos grânulos do padrão nuclear pontilhado grosso, as quais foram correlacionadas a auto-anticorpos específicos identificados por ELISA. Cinquenta e nove (59) amostras de soros do padrão nuclear pontilhado grosso foram analisadas, sendo 25 positivas para o anticorpo anti-U1RNP, 17 para anti-Sm/U1RNP e 17 soros-controle (negativos para anti-U1RNP e anti-Sm/U1RNP). Todas as amostras eram negativas para os anticorpos presentes no padrão nuclear pontilhado fino. As análises dos resultados demonstraram que o padrão nuclear pontilhado grosso, positivo para os anticorpos anti-U1RNP e anti-Sm/U1RNP, apresenta grânulos compreendidos entre  $25,4\mu^2$  e  $155,9\mu^2$ , sendo que grânulos com valores acima de  $155,9\mu^2$  estariam provavelmente relacionados a anticorpos inespecíficos, ainda não identificados.

## SUMÁRIO

1.	Introdução .....	1
2.	Objetivos .....	14
3.	Material e métodos .....	15
3.1.	Casuística .....	15
3.2.	Aspectos éticos .....	17
3.3.	Imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2 (FAN HEp-2) .....	17
3.4.	Leitura da reação de IFI e captura das imagens .....	20
3.5.	Medida da área dos grânulos do padrão nuclear pontilhado grosso .....	22
3.6.	Enzimaimunoensaio para detecção dos auto-anticorpos específicos .....	22
4.	Resultados .....	24
5.	Discussão .....	27
6.	Conclusões .....	30
7.	Referências bibliográficas .....	31
8.	Anexos .....	39

## 1. INTRODUÇÃO

O sistema imunitário tem como principal função a proteção do organismo por meio de mecanismos específicos que reconhecem antígenos estranhos ao hospedeiro (patógenos biológicos ambientais e toxinas químicas), além de ser responsável pela manutenção da tolerância aos antígenos teciduais próprios (mecanismos de auto-regulação). Esta habilidade em diferenciar o próprio do não-próprio é um processo fisiológico direcionado e determinado por três estruturas de reconhecimento: (1) os produtos glicoprotéicos do complexo principal de histocompatibilidade (CPH), (2) os receptores de células T e (3) as imunoglobulinas (Hang & Nakamura, 1997).

No entanto, perturbações na tolerância imunológica, caracterizadas pelo reconhecimento de componentes próprios (auto-antígenos) como estranhos, resultam em respostas dirigidas contra os tecidos próprios ou auto-antígenos gerando lesões teciduais. Esta resposta anormal do sistema imunitário é denominada auto-imunidade e pode cursar como resposta auto-imune humoral e/ou celular (Wunder, 2001).

Cohen & Cooke (1986) descrevem dois tipos de respostas auto-ímmunes, a fisiológica e a patológica. Na resposta auto-ímmune fisiológica, os auto-anticorpos naturais (anticorpos dirigidos contra auto-antígenos) ajudam a eliminar resíduos catabólicos, como por exemplo, antígenos próprios e não-próprios degradados, para a manutenção da homeostase e auto-regulação. Estas são respostas auto-ímmunes que ocorrem associadas às respostas ímmunes “protetoras” contra agentes ambientais biológicos ou químicos prejudiciais à saúde. A resposta auto-ímmune fisiológica normalmente é passageira e não provoca doença.

A resposta auto-ímmune patológica é caracterizada pela presença de auto-anticorpos e células imunoregulatórias ativadas, assim como mediadores inflamatórios e uma série de outras substâncias como as citocinas, fatores de crescimento, fatores estimulantes da colônia de macrófagos, interferon gama e fator



de necrose tecidual. Estes também podem participar da fase de danos imunológicos teciduais que destroem o auto-antígeno de tecidos ou órgãos. As respostas auto-imunes patológicas estão freqüentemente associadas a uma estimulação imune recorrente ou mantida que leva ao dano tecidual em indivíduos geneticamente susceptíveis. Alguns indivíduos apresentam uma predisposição genética ao desenvolvimento de processos auto-imunes os quais contribuem para o surgimento de doenças.

Fatores genéticos, ambientais e hormonais influenciam as respostas imunes e também podem contribuir para o desenvolvimento da auto-imunidade e de doenças auto-imunes, atuando diretamente como imunoestimuladores. Outros fatores, como a semelhança estrutural entre antígenos presentes em uma partícula viral estranha e proteínas do hospedeiro podem ativar uma reação cruzada mediada por linfócitos T. Acredita-se que alguns agentes infecciosos, como o vírus Epstein-Barr (Tosato *et al*, 1984), o vírus da leucemia de células T humanas (HTLV-1) e as bactérias dos gêneros *Streptococcus* e *Yersinia* possam induzir a auto-imunidade.

Atualmente, observamos um aumento no número de indivíduos, em todo o mundo, afetados por alguma doença auto-imune (Lernmark, 2001). Por isso, elas estão sendo consideradas uma das principais causas de problemas de saúde, tanto em sociedades industrializadas quanto naquelas em desenvolvimento. Isso devido à cronicidade presente nessas desordens e aos efeitos incapacitantes por elas desencadeados (Jacobson *et al*, 1997 e Retig & Levinsky, 1991).

Existem mais de 40 doenças auto-imunes conhecidas afetando cerca de 5 a 10% da população geral, podendo ser de características endócrinas, neuromusculares, hematopoiéticas, cardiopulmonares, gastrointestinais, dermatológicas e reumatológicas. Estas doenças são heterogêneas quanto à sua etiologia e patogênese, sendo necessárias interações complexas entre fatores endógenos (genéticos e imunológicos) e exógenos (ambientais) para desencadear os mecanismos auto-agressores (Carson, 1992).

De acordo com Roitt *et al* (1992) as doenças associadas aos fenômenos auto-imunes tendem a distribuir-se dentro de um determinado espectro. Em um dos extremos, temos o exemplo da tireoidite de Hashimoto, onde os

anticorpos produzidos são dirigidos contra um órgão específico do corpo, a tireóide. No outro, exemplificado pelo Lúpus eritematoso sistêmico (LES), temos anticorpos direcionados a antígenos que estão disseminados pelo corpo (ex., proteínas nucleares) e as lesões características da doença são também largamente disseminadas. Podemos então classificar as doenças auto-imunes em órgão específicas e sistêmicas.

Qualquer que seja a relação dos auto-anticorpos com o processo da doença, eles fornecem, sem dúvida, marcadores valiosos que podem ser explorados para propósitos diagnósticos. Atualmente, testes para uma grande variedade de auto-anticorpos diferentes são realizados em laboratórios de imunologia, como métodos auxiliares no diagnóstico das doenças auto-imunes (Adams & Mutasim, 2000).

Em 1948 (Hargraves *et al*), a observação do fenômeno da célula LE (lúpus eritematoso) no qual os neutrófilos são capazes de englobar núcleos de outras células recobertas pelo anticorpo anti-núcleo, em concentrados de medula óssea de pacientes com LES, incitou a pesquisa de uma ampla variedade de novos auto-anticorpos direcionados contra antígenos nucleares, denominados anticorpos antinucleares (AAN) ou fator antinuclear (FAN). Atualmente, vários AANs são utilizados como parâmetros de diagnóstico da maioria das doenças do tecido conjuntivo, como o Lúpus eritematoso sistêmico, Síndrome do lúpus neonatal, Síndrome de Sjögren, Esclerodermia, Miosite auto-imune, Doença mista do tecido conjuntivo, entre outras enfermidades (Hiepe *et al*, 2000).

De acordo com Holborow *et al* (1957) e Brigdes *et al* (1996) uma variedade de ensaios laboratoriais (imunofluorescência indireta, imunodifusão dupla, contra-immunoeletoforese, hemaglutinação, enzimaímunoensaio e imunodot) tem sido usada para identificar anticorpos específicos para mais de 50 antígenos nucleares diferentes. Alguns destes antígenos são encontrados apenas em uma única doença, enquanto outros podem ser encontrados em diversas doenças auto-imunes (Cook, 1998).

Segundo Wanchu (2000), os anticorpos antinucleares compreendem um grupo de auto-anticorpos bastante heterogêneos quanto à sua especificidade

antigênica, já que estes são dirigidos contra componentes intracelulares tanto nucleares quanto citoplasmáticos. Esses anticorpos são de grande relevância clínica para o diagnóstico de doenças reumáticas auto-imunes e sua presença pode variar de acordo com a atividade da doença. Entretanto, para uma conclusão correta os auto-anticorpos encontrados devem ser cuidadosamente considerados e interpretados dentro de um contexto clínico, pois provavelmente ocorrem na circulação de todo indivíduo, mas o teste só é considerado positivo se eles ocorrerem em títulos acima do valor considerado normal (Hietarinta & Lassila, 1996).

A identificação do auto-anticorpo é importante para auxiliar na descoberta da etiologia e patogênese da doença, como também para melhorar os ensaios laboratoriais úteis ao diagnóstico das doenças auto-imunes (Lernmark, 2001). Algumas doenças auto-imunes apresentam características clínicas muito comuns o que dificulta o seu diagnóstico. Uma vez que são doenças crônicas incapacitantes, quanto mais precoce o diagnóstico, mais preservados estarão as funções do paciente. Nesse contexto é fundamental dispormos de marcadores que auxiliam o clínico no diagnóstico dessas enfermidades. Podemos citar como exemplo, a importância da detecção de auto-anticorpos no LES como um dos 11 critérios usados para a identificação da doença de acordo com o Colégio Americano de Reumatologia. A presença de pelo menos quatro parâmetros sugere o diagnóstico de LES e geralmente um dos quatro é a presença de auto-anticorpos (Tan *et al*, 1982 e Hochberg, 1997).

A estimativa da incidência do LES na população brasileira é de 8,7/100.000/ano, sendo que nas mulheres a incidência é de 14,1 e nos homens, de 2,2/100.00/ano (Vilar & Sato, 2002).

De acordo com Arbuckle *et al* (2003) os auto-anticorpos estão presentes muitos anos antes do diagnóstico do LES. Além disso, o aparecimento destes auto-anticorpos em pacientes lúpicos tende a seguir um curso previsível, com uma acumulação progressiva de anticorpos específicos antes do início da doença, enquanto o paciente ainda apresenta-se sem sintomas. Alguns auto-anticorpos (anti-SSA/Ro e anti-SSB/La) geralmente precedem o começo do LES em vários anos. Outros como o anticorpo anti-Sm e anti-ribonucleoproteínas, aparecem apenas

alguns meses antes do diagnóstico, durante o aparecimento das manifestações clínicas.

Portanto, inconformidades nos resultados da pesquisa de auto-anticorpos podem resultar em um falso diagnóstico e conseqüentemente em uma terapia inapropriada (Kavanaugh *et al*, 2000). Além disso, alguns auto-anticorpos estão associados a manifestações clínicas do lúpus, por exemplo, os anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La associados à síndrome seca e o anticorpo anti-U1RNP ao Fenômeno de Raynaud (Hoffman *et al*, 2004).

A identificação dos AANs exerce um papel importante na clínica médica, principalmente em relação às doenças reumáticas auto-imunes. A detecção de AANs para o diagnóstico de doenças sistêmicas e órgão-específicas tem aumentado progressivamente desde que a técnica de imunofluorescência foi utilizada como triagem de auto-anticorpos (Pfrimer *et al*, 2001).

No passado, eram utilizados como substrato para a imunofluorescência indireta, cortes de tecidos de rato ou *imprint* de fígado de camundongo, substratos que apresentavam baixa sensibilidade, especialmente para os anticorpos específicos anti-SSA/Ro, encontrados no LES (Harmon *et al*, 1984). Atualmente, são utilizadas células originadas de carcinoma laríngeo humano (células HEp-2) que crescem em monocamadas sobre lâminas de vidro. Estas células apresentam maior sensibilidade que os substratos animais usados anteriormente por serem células humanas e apresentarem uma melhor qualidade e quantidade de antígenos, possuírem todas as fases da divisão celular (intérfase/prófase, metáfase, anáfase e telófase) e apresentarem uma relação núcleo citoplasma favorecendo o núcleo, assim como uma maior quantidade de nucléolos (Ulvestad *et al*, 2000).

Segundo Dellavance *et al* (2003) a técnica de imunofluorescência indireta (IFI) que utiliza como substrato células HEp-2 (FAN HEp-2) é um teste sensível, semi-quantitativo e atualmente o de escolha para a triagem de uma grande variedade de auto-anticorpos. Neste teste, os auto-anticorpos séricos ligam-se a auto-antígenos específicos contidos no substrato utilizado (célula HEp-2).

Conforme a região e estrutura celular que os auto-anticorpos reconhecem, existem mais de 30 padrões de imunofluorescência diferentes que são

divididos em 5 grupos: nuclear (homogêneo, homogêneo periférico e pontilhado), nucleolar, citoplasmático, do aparelho mitótico e misto, dependendo do local de fixação do auto-anticorpo. Cada padrão de FAN expressa a detecção de um ou mais auto-anticorpos sendo este resultado relevante para o diagnóstico clínico ou de grande importância para nortear o médico na próxima investigação a ser solicitada.

Apesar do avanço na técnica de imunofluorescência, este método ainda apresenta muitos resultados falso-positivos em indivíduos saudáveis (Tan *et al*, 1997). Por outro lado, as interpretações dos resultados apresentam variações entre as diversas instituições, pois o procedimento é manual e requer tempo e treino, sendo a análise dos padrões subjetiva, pois é julgada visualmente (Feltkamp, 1997 e Sack *et al*, 2003).

Uma das vantagens da IFI em células HEp-2 é que a técnica permite o rastreamento de uma ampla variedade de auto-anticorpos e sua sensibilidade é extremamente alta e, com algumas exceções, é capaz de detectar auto-anticorpos mesmo em pequenas concentrações. Porém, na maioria dos casos, o ensaio é incapaz de identificar a especificidade do auto-anticorpo (Dahle *et al*, 2004).

Segundo Andrade *et al* (1998) o padrão de imunofluorescência pode fornecer uma idéia preliminar de possíveis auto-anticorpos envolvidos, mas não define com precisão a especificidade. Já nos casos de testes de identificação, é feito um ensaio para cada especificidade de anticorpo. Portanto, os testes de rastreamento e identificação devem ser usados de forma complementar.

Alguns padrões de fluorescência são ocasionados por um número restrito de auto-anticorpos, enquanto que outros estão associados a um auto-anticorpo como, por exemplo, o anti-PCNA (anti-antígeno nuclear associado à proliferação celular) que está associado ao padrão nuclear pontilhado pleomórfico (Pfrimer *et al*, 2001). Neste caso, o padrão de fluorescência pode ser suficiente para a definição da especificidade do auto-anticorpo.

Outros padrões de fluorescência, como os padrões nucleares pontilhado fino e pontilhado grosso, entretanto, são relativamente inespecíficos, podendo ser caracterizados por vários auto-anticorpos distintos. Geralmente, o padrão de fluorescência não pode identificar qual o auto-anticorpo presente, mas sua

definição é de vital importância, pois sugere ao clínico qual o próximo passo a ser seguido na investigação de sua especificidade (Pfrimer *et al*, 2001). Outro fator importante é o fato dos padrões nucleares pontilhado grosso e pontilhado fino apresentarem as mesmas características, a diferença encontra-se apenas no tamanho dos grânulos. No primeiro, os grânulos apresentam um aspecto grosseiro e podem ser individualizados. No segundo caso conseguimos observar uma fina granulação, porém não podemos individualizar os grânulos, eles são bem menores.

No padrão nuclear pontilhado fino, observam-se pontos de aspecto pontilhado fino nas células em intérfase, com nucléolos não reagentes. Nas placas metafásicas cromossômicas a cromatina não fluoresce. Por outro lado, no padrão nuclear pontilhado grosso observa-se nucleoplasma pontilhado grosso, às vezes fino, nucléolos, citoplasma e placas metafásicas cromossômicas negativas, ou seja, não apresentam fluorescência. Podemos notar então, que ambos os padrões de imunofluorescência acima citados, são diferenciados apenas visualmente, pelo tamanho dos grânulos presentes no núcleo celular, podendo gerar dúvidas ao observador.

O padrão nuclear pontilhado fino está envolvido com os auto-anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La. O auto-anticorpo anti-SSA/Ro pode ser encontrado em 70 a 100% dos pacientes com Síndrome de Sjögren (SS) (Tabela 1), e quando ocorrendo sozinho em pacientes com LES tem sido associado com uma alta incidência de anti-dsDNA concomitante, fotosensibilidade, lesões cutâneas subagudas, vasculite, pneumonite intersticial, nefrite, linfadenopatia e leucopenia (Provost & Reichlin, 1988). Estes anticorpos são também encontrados na síndrome do lúpus eritematoso neonatal caracterizado pelo bloqueio congênito do coração e irritações na pele; isto é um exemplo de transferência transplacentária passiva de doença autoimune para o feto por anticorpos IgG de mães com LES (Buyon & Winchester, 1990).

Auto-anticorpos anti-SSB/La são detectados em 45% dos pacientes com LES e em 40 a 90% dos pacientes com Síndrome de Sjögren (Tabela 1), mais raramente em pacientes com SS secundária. Estes auto-anticorpos são direcionados contra proteínas envolvidas na maturação dos transcritos da polimerase III.

Pacientes com LES simultaneamente com os auto-anticorpos anti-SSA/Ro e SSB/La tem curso da doença mais ameno do que aqueles sem o anti-SSB/La (Zweiman & Lisak, 1991 e Chan & Tan, 1989).

Tabela 1. Anticorpos associados às doenças auto-imunes.

Auto-anticorpos	Doença	Positividade de auto-anticorpos
Anti-Sm	LES	25 a 30% (Pardini, 2001)
Anti-U1RNP	DMTC	100% (Reichlin & van Venrooij, 1991)
	LES	20 a 30% (Reichlin & van Venrooij, 1991)
Anti-SSA/Ro	Lúpus discóide	5 a 20% (Wenzel <i>et al</i> , 2001)
	Lúpus cutâneo subagudo	30 a 88% (Lopez-Longo <i>et al</i> , 1997)
	LES	35% (Pardini, 2001)
	Lúpus neonatal	86 a 96% (Gordon <i>et al</i> , 2004)
	Síndrome de Sjögren	70 a 100% (Provost & Reichlin, 1988)
Anti-SSB/La	Lúpus discóide	5 a 10% (Wenzel <i>et al</i> , 2001)
	Lúpus cutâneo subagudo	40 a 60% (Wenzel <i>et al</i> , 2001)
	LES	45% (Zweiman & Lisak, 1991)
	Síndrome de Sjögren	40 a 90% (Zweiman & Lisak, 1991)

O padrão nuclear pontilhado grosso pode estar relacionado aos auto-anticorpos anti-Sm (Smith, nome do primeiro paciente em que foi reconhecido), anti-U1RNP ou ainda outros não bem definidos (Cook, 1998). Estudos de Nyman *et al* (1986) e Ringertz *et al* (1986), usando a técnica de imunofluorescência e a análise digital das imagens, demonstraram que os padrões de fluorescência determinados pelos anticorpos anti-Sm e anti-U1RNP são visualmente idênticos.

Ao observar uma lâmina de imunofluorescência indireta em células HEp-2 conseguimos identificar o padrão nuclear pontilhado grosso, mas não podemos determinar o auto-anticorpo presente. Esta identificação é de grande

importância, pois de acordo com o auto-anticorpo (anti-Sm ou anti-U1RNP) as suspeitas clínicas podem ser diferentes.

Os antígenos Sm e U1RNP são um grupo de moléculas heterogêneas constituídas de proteínas associadas com o snRNA (small nuclear ribonuclear acid). O anticorpo anti-Sm está relacionado a diversos polipeptídeos, principalmente B (28 KD), B' (29 KD), D (16 KD), E (12 KD), F (11KD) e G (9 KD) associados ao “splicing” do RNAm (Wallace & Hahn 1993). Este auto-anticorpo é específico para o LES (Egner, 2000), apresentando uma relação variável com a doença ativa (Hiepe *et al*, 2002 e Evans, 1998), porém é encontrado em apenas 25 a 30% dos pacientes lúpicos (Tabela 1) (Pardini, 2001). Foi demonstrado envolvimento do sistema nervoso central (SNC), doença renal, fibrose pulmonar e pericardites em pacientes lúpicos que apresentam o anticorpo anti-Sm. O anticorpo anti-Sm apresenta-se com maior frequência em crianças negras do que em caucasianas com LES juvenil e foi descrito em casos isolados de artrite reumatóide (Dellavance *et al*, 2003).

Os antígenos U1RNPs possuem participação essencial no mecanismo de “splicing” do RNAm. Os anticorpos anti-U1RNP reconhecem, preferencialmente, os polipeptídeos de 70 KD, 33 KD e 20 KD e estão presentes em 100% dos pacientes com doença mista do tecido conjuntivo (DMTC). Também estão presentes em 20 a 30% dos pacientes com LES (Tabela 1) e, menos frequentemente, na esclerose sistêmica, artrite reumatóide, Síndrome de Sjögren e polimiosite (Reichlin & van Venrooij, 1991). Quando ocorrendo como o tipo predominante em pacientes com LES sem anti-dsDNA (anti-DNA de dupla hélice) simultâneos, são associados com doença renal leve. Os antígenos Sm e U1RNP estão intimamente associados, cada um sendo partículas subcelulares de pequenos RNAs nucleares complexados à proteínas (Zweiman *et al*, 1991 e Tan, 1989).

Após o teste de triagem positivo (FAN+) deverá ser realizada a determinação dos possíveis auto-anticorpos presentes naquele padrão, pois diferentes auto-anticorpos podem formar padrões semelhantes, ou seja, um teste de FAN positivo sugere a presença de prováveis auto-anticorpos, que deverão ser confirmados por outras técnicas mais específicas, caso seja importante para o diagnóstico clínico (Andrade *et al*, 1998).



Dentre estes ensaios, o ensaio imunoenzimático (ELISA) é a técnica mais utilizada por apresentar uma boa sensibilidade e especificidade. Além disso, requer menos tempo na realização da técnica, pois a leitura é feita em poucas horas e de forma automatizada, não exigindo treinamento diferenciado na sua interpretação (Bridges *et al*, 1996). Os ensaios de fase sólida proporcionam grande sensibilidade, pois durante o processo de lavagem os auto-anticorpos em contato direto com os antígenos fixos na placa, não são removidos facilmente. Desta forma, auto-anticorpos em baixas concentrações são fixados, podendo ser detectados (Andrade *et al*, 1998).

A realização do teste de ELISA, geralmente utilizado para a identificação de apenas um auto-anticorpo por teste, se justifica principalmente quando nos deparamos com soros com padrões duvidosos, quando a diferenciação entre padrão nuclear pontilhado grosso e pontilhado fino não é muito visível gerando dúvidas no observador. Entretanto, a realização de testes complementares, como o ensaio imunoenzimático, para a identificação do auto-anticorpo, aumenta os custos para o laboratório clínico.

A IFI e o ELISA são os testes mais utilizados para rastreamento e detecção de auto-anticorpos. Estes métodos avaliam, principalmente, a ligação dos auto-anticorpos aos auto-antígenos e podem ser 1000 vezes mais sensíveis do que outros testes utilizados, como por exemplo, a imunodifusão dupla e a contagem imunoeletroforética (CIE) que requerem reações de precipitação entre os anticorpos e extrato de tecido/células (Nakamura & Tan, 1986 e Nakamura *et al*, 1994). Entretanto, a precisão dos testes de rastreamento de IFI pode ser afetada pela (1) má qualidade do substrato ou na fixação do mesmo, (2) precisão dos microscópios e (3) interpretações subjetivas dos resultados (Bylund & Nakamura, 1991).

De acordo com Nakamura & Tan (1992), testes altamente sensíveis e úteis para a exclusão de doença têm baixa especificidade diagnóstica, enquanto ensaios menos sensíveis podem oferecer uma melhor especificidade diagnóstica. Por exemplo, pacientes com testes de IFI negativos tem menos de 0,14% de chance de ter LES. Testes de IFI positivos, contudo, podem ser vistos em 25 a 50% de

pacientes com desordens inflamatórias crônicas e artrite reumatóide, bem como 5 a 10% de indivíduos saudáveis.

A interpretação dos resultados dos testes deve ser feita com referência à história médica do paciente e estadiamento da doença. De igual importância é a consciência das limitações técnicas dos sistemas de testes empregados. Em geral, altos títulos (>320) de auto-anticorpos são significantes na avaliação diagnóstica de uma doença auto-imune específica. Títulos baixos ou ausentes, contudo, não excluem a doença, pois os auto-anticorpos podem não ser detectados devido a sua neutralização por antígenos circulantes, liberados por tecidos danificados, como no caso de tireoidite autoimune severa. O título de um teste de FAN é significativo para o diagnóstico clínico, pois títulos baixos são encontrados em indivíduos saudáveis (Ward, 1998).

Os auto-anticorpos podem ser detectados em condições não auto-imunes, como hepatite crônica, neoplasias, tuberculose, malária e endocardite bacteriana subaguda (von Mühlen & Tan, 1994 e Sontheimer *et al*, 1991). Geralmente, observamos títulos mais baixos nestes casos do que na presença de doenças auto-imunes (de Vlam *et al*, 1993).

Em um estudo realizado na Fundação Pró-Sangue - Hemocentro de São Paulo por Fernandez *et al* (2003) constatou-se a presença de AANs em 22,6% das amostras estudadas de indivíduos saudáveis, sendo a maioria com baixos títulos (1/40). Além disso, auto-anticorpos naturais podem ser encontrados em 20 a 50% de indivíduos saudáveis e assintomáticos em todas as faixas etárias, incluindo recém nascidos. A maioria dos AANs são de baixa avidéz para IgM e seu repertório antigênico é semelhante àquele visto nos auto-anticorpos de várias doenças auto-imunes (Youinou *et al*, 1993 e Abu-Shakra & Schoenfeld, 1993).

Segundo Hooper (1992) e Hawkins (1979) pessoas do sexo feminino têm uma maior incidência de AANs do que pessoas do sexo masculino, esta incidência aumenta em mulheres grávidas (Kiuttu *et al*, 1994) e idosos, pessoas com idade superior a 60 anos (Xavier *et al*, 1995).

Hang & Nakamura (1997) relatam que progressos no campo da biologia molecular e da imunologia têm levado a uma melhora nos testes laboratoriais para as

doenças auto-imunes tornando a classificação da doença, diagnóstico e prognóstico mais precisos. Além disso, os avanços técnicos na genética molecular e na imunologia têm facilitado nossa busca por uma identificação de suscetibilidade gênica para doenças auto-imunes desencadeadas por fatores ambientais.

De igual importância, é a compreensão de que auto-anticorpos circulantes, células linfóides reativas e suscetibilidade gênica auto-imune associadas podem ser encontrados em indivíduos saudáveis (Tan *et al*, 1997), mas que cada fator, por si mesmo, é insuficiente para causar doença. Ações conjuntas por eventos ambientais adversos são necessárias para induzir e manter as respostas auto-imunes patológicas em indivíduos geneticamente suscetíveis até que um certo “limiar” seja superado para manifestações clínicas da doença.

Baseado na clínica e na prescrição razoável de exames complementares, o raciocínio rigoroso se aplica à decisão terapêutica em reumatologia. No centro da decisão terapêutica, somente o doente conta, suas queixas, os incômodos por ele experimentados e as medidas necessárias a manter a sua “qualidade de vida”. A escolha de procedimentos terapêuticos já comprovados e publicados é, em reumatologia, como no conjunto das demais especialidades, evidentemente preferível. Entretanto, esta escolha é por vezes difícil, principalmente nos casos em que os trabalhos científicos ainda não encontraram todos os mecanismos implicados nas doenças, como por exemplo, as doenças auto-imunes. Paralelamente, podemos nos encontrar diante de doenças de apresentação ou curso atípicos, variáveis e/ou complicados, necessitando de reavaliações do estado clínico e de repetições dos testes diagnósticos. Por exemplo, a detecção do FAN faz parte dos critérios diagnósticos do LES, entretanto, podemos às vezes nos deparar com um quadro clínico associado a um FAN negativo ou duvidoso.

Jamais será o bastante dizer que a decisão médica recai, sobretudo no exame clínico detalhado e rigoroso. Entretanto, devem ser levados em conta os parâmetros fornecidos pelos exames complementares. A realização destes é cada vez mais acessível e a tendência à prescrição exagerada é tão freqüente que ousaríamos mesmo dizer, por vezes, abusiva.

Sem mesmo considerar os custos práticos, os problemas enfrentados pelo clínico que se depara diante dos resultados destes exames se tornam, por vezes, “espinhosos”: qual é a relação de causa e efeito entre lesão provável (constatada objetivamente sobre uma imagem ou um exame clínico) e o incômodo sentido pelo doente? Admite-se que é absurdo e prejudicial, por exemplo, reduzir todas as hiperuricemias, aumentar todas as massas ósseas um pouco baixas, ou operar todas as hérnias discais; assim como tratar um FAN positivo. Somente a prática experimentada, baseada em uma argumentação rigorosa, permite avaliar os problemas dos diagnósticos que se resumem a um simples exame complementar e que levam a terapêuticas altamente prejudiciais pelos seus efeitos colaterais.

A utilização inapropriada dos testes imunológicos pode resultar em erros diagnósticos, tratamento inadequado e gastos desnecessários para as Instituições de saúde.

Nós pretendemos, com o nosso trabalho, fornecer informações complementares que possam nortear a conduta reumatológica, mais precisamente aquela relacionada às doenças auto-imunes onde a produção de auto-anticorpos como o FAN, está implicada na patogênese da doença. Com isto poderíamos tornar a decisão terapêutica mais segura e melhorar o prognóstico em casos em que o retardo na decisão terapêutica poderia ter conseqüências irreversíveis para o doente.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Determinar, através de um método informatizado, o tamanho dos grânulos do padrão nuclear pontilhado grosso, detectados em exames de FAN HEp-2 por imunofluorescência indireta (IFI).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Determinar as medidas das áreas dos grânulos do padrão nuclear pontilhado grosso em exames de FAN HEp-2 (IFI) e correlacionar estas medidas com os possíveis auto-anticorpos presentes neste padrão e identificados pelo método de enzimaensaio (ELISA).
- Minimizar possíveis erros de interpretação subjetiva relacionados ao laudo do padrão nuclear pontilhado grosso em FAN HEp-2, assim como melhorar a especificidade deste.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Casuística

Foram incluídas neste estudo 59 amostras de soros positivos ( $T \geq 320$ ) para o padrão nuclear pontilhado grosso. Estudos preliminares demonstraram que títulos superiores a 320 proporcionam uma melhor definição da imunofluorescência indireta e conseqüentemente, uma melhor imagem para a captação e a realização das medidas dos grânulos no padrão nuclear pontilhado grosso.

Foram considerados como critérios de inclusão no estudo: (1) amostras com título superior a 320 para uma melhor captura das imagens; (2) imagens com características de padrão nuclear pontilhado grosso definido de acordo com o 2º Consenso Brasileiro de FAN HEp-2 (Dellavance *et al*, 2003), definido pela coloração do nucleoplasma em grânulos grosseiros e nucléolos, citoplasma, aparelho mitótico e placa metafásica cromossômica negativas; (3) negatividade para os anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La, presentes no padrão nuclear pontilhado fino, confirmando se tratar do padrão nuclear pontilhado grosso.

Do total de amostras adquiridas, 17 foram positivas para o auto-anticorpo anti-Sm/U1RNP e 25 positivas para o auto-anticorpo anti-U1RNP. Os 17 soros restantes eram negativos para os auto-anticorpos anti-Sm, anti-U1RNP, e foram considerados soros controles (Figura 1).

As amostras foram obtidas das sorotecas do Laboratório da Área da Saúde (LAS) do Departamento de Biomedicina (CBB) da Universidade Católica de Goiás (UCG), do Padrão Laboratório Clínico e Medicina Laboratorial (Goiânia-GO) e do Laboratório Frischmann Aisengart (Curitiba-PR).

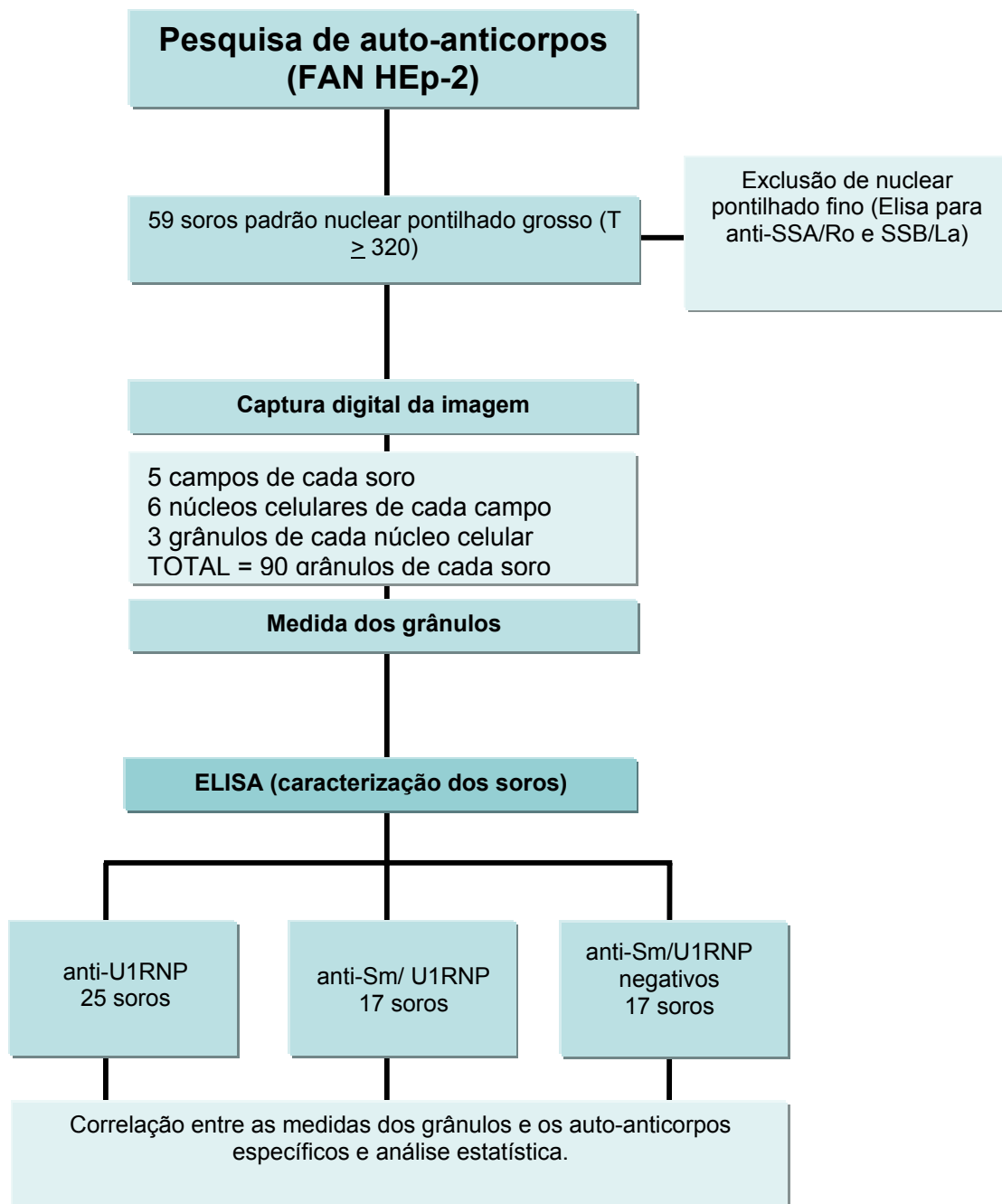


Figura 1. Esquema resumido do Protocolo geral

### **3.2. Aspectos éticos**

O projeto da presente dissertação foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética da Universidade Católica de Goiás (Protocolo COEP/UCG 0043/2003). Os dados pessoais dos pacientes não foram revelados aos participantes da pesquisa.

### **3.3. Imunofluorescência indireta (IFI) em células HEp-2 (FAN HEp-2)**

A reação de imunofluorescência indireta em células HEp-2 (HEMAGEN, USA) é baseada no uso de células de carcinoma laríngeo humano como substrato para a detecção de possíveis auto-anticorpos presentes no soro (Figura 2). O uso das células HEp-2 é vantajoso pelo fato destas apresentarem antígenos humanos em uma maior concentração, o que não obteríamos utilizando tecidos de roedores. No mais, as células HEp-2 expressam todas as fases do ciclo celular (intérfase/prófase, metáfase, anáfase e telófase), apresentam uma relação núcleo-citoplasma em favor do núcleo, o que facilita o reconhecimento de vários rearranjos fluorescentes e ainda, vários nucléolos.

Conforme o local de ligação do auto-anticorpo, presente no soro dos pacientes, são expressos os vários padrões de FAN, que podem ser nucleares, nucleolares, citoplasmáticos, do aparelho mitótico ou mistos. Os padrões nucleares podem apresentar vários aspectos, como por exemplo, um pontilhado grosso (Figura 3) ou pontilhado fino (Figura 4), sendo que, neste estudo foi analisado o padrão nuclear pontilhado grosso, o qual está relacionado aos anticorpos específicos anti-Sm e anti-U1RNP.

Inicialmente, os soros selecionados foram diluídos a 1/40 em solução tampão (PBS). Foram pipetados 25µL de cada soro e controles positivo e negativo presente no kit de FAN HEp-2 em cada cavidade da lâmina e a mesma foi incubada por 30 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente.

Para o procedimento de lavagem, as amostras foram cuidadosamente removidas das cavidades das lâminas e posteriormente imersas e homogeneizadas



por 10 minutos em PBS. Ao final deste tempo, a solução de PBS foi removida dos frascos e substituída por mais PBS e o procedimento repetido.

As lâminas foram removidas da solução de PBS e a cada cavidade foi aplicada uma gota (30 $\mu$ L) de conjugado, que é um anticorpo anti-imunoglobulina humana marcado com isotiocianato de fluoresceína. A reação foi incubada novamente por 30 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O procedimento de lavagem foi repetido. A cada cavidade da lâmina foi adicionada uma gota de glicerina tamponada com fosfato, e a lâmina coberta com uma lamínula e em seguida realizada a leitura no microscópio de fluorescência.

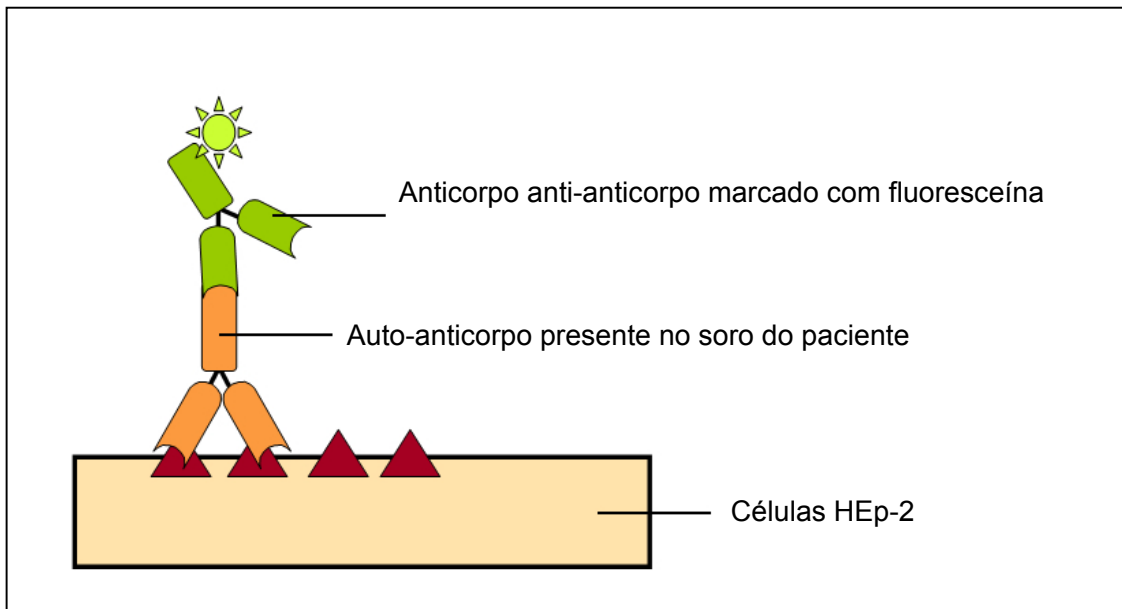


Figura 2. Técnica de imunofluorescência indireta (FAN HEp-2)

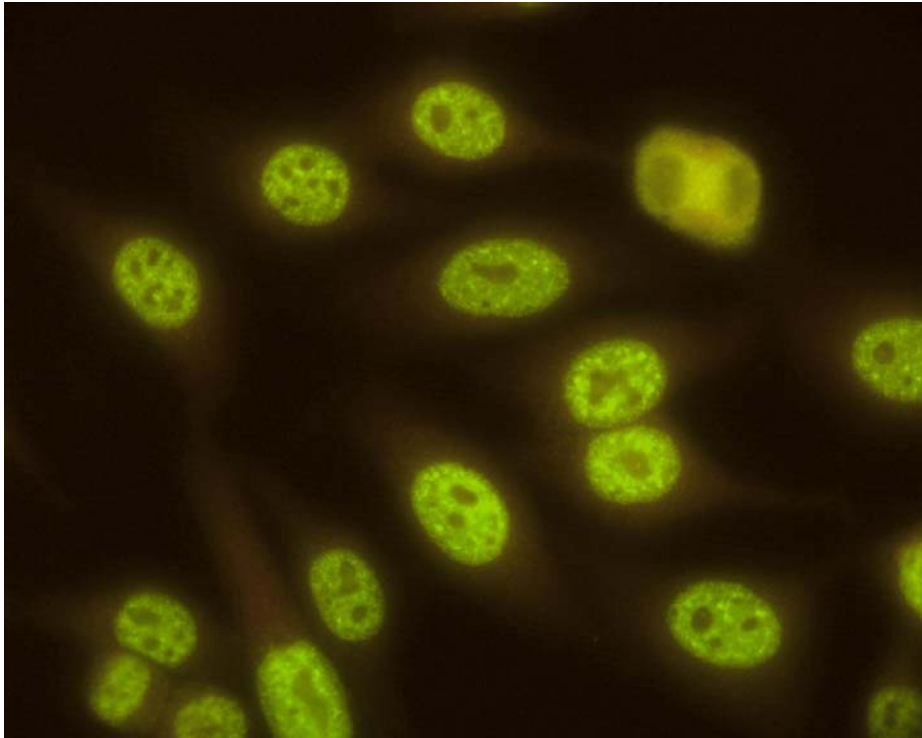


Figura 3. Padrão nuclear pontilhado grosso

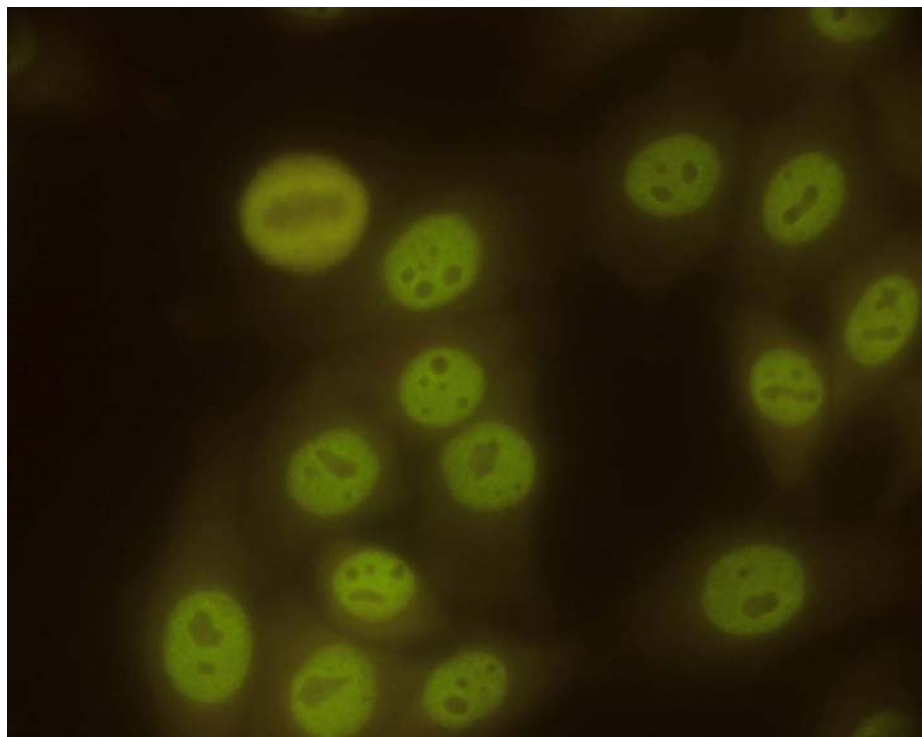


Figura 4. Padrão nuclear pontilhado fino

### **3.4. Leitura da reação de IFI e captura das imagens**

A leitura da reação e a captura das imagens das lâminas de imunofluorescência foram realizadas em um microscópio DMLB (LEICA, Alemanha), trinocular, com revólver sêxtuplo e com objetivas N Planocromáticas de correção infinita, condensador universal NA1.30 para contraste de fase, campo escuro e campo claro, iluminação transmitida para campo claro de 100watts, acoplada com sistema de fluorescência, lâmpada de vapor de mercúrio de alta pressão de 100watts e filtros FIPC para acridine orange e RG N2.1 para ficoeritrina e BG 38 para isotiocianato de fluoresceína. Ao microscópio foi acoplada uma microcâmara digital DC200 (LEICA, Alemanha) para captação das imagens, ligada a um computador Pentium III (ACER VERITON 5100, USA), utilizando o software IM50 (LEICA, Alemanha).

Para a captura das imagens, primeiramente foi focado um campo na região central da cavidade da lâmina o qual foi fotografado. Em seguida, capturaram-se as imagens de um campo acima, um abaixo, um à direita e um à esquerda do campo focado inicialmente. No total, foram capturadas cinco imagens (campos) de cada amostra, realizados recortes em cada imagem selecionando-se seis núcleos celulares por amostra. Os núcleos celulares foram selecionados de acordo com a intensidade da fluorescência por eles apresentada. Em um mesmo campo partes da imagem podem apresentar-se mais escuras, os núcleos localizados nestes locais não foram selecionados.

Em cada núcleo foram realizadas as medidas de três grânulos, perfazendo um total de noventa grânulos medidos em cada amostra. Estes cortes foram processados no programa MatLab (THE MATHWORKS Inc, USA) para definição e delineamento dos grânulos e armazenados para posterior medida (Figura 5). Os grânulos medidos foram selecionados a partir da comparação com a imagem original, ou seja, grânulos totalmente delimitados e que correspondiam a grânulos de mesmo tamanho e localizados na mesma posição que aqueles da imagem original.

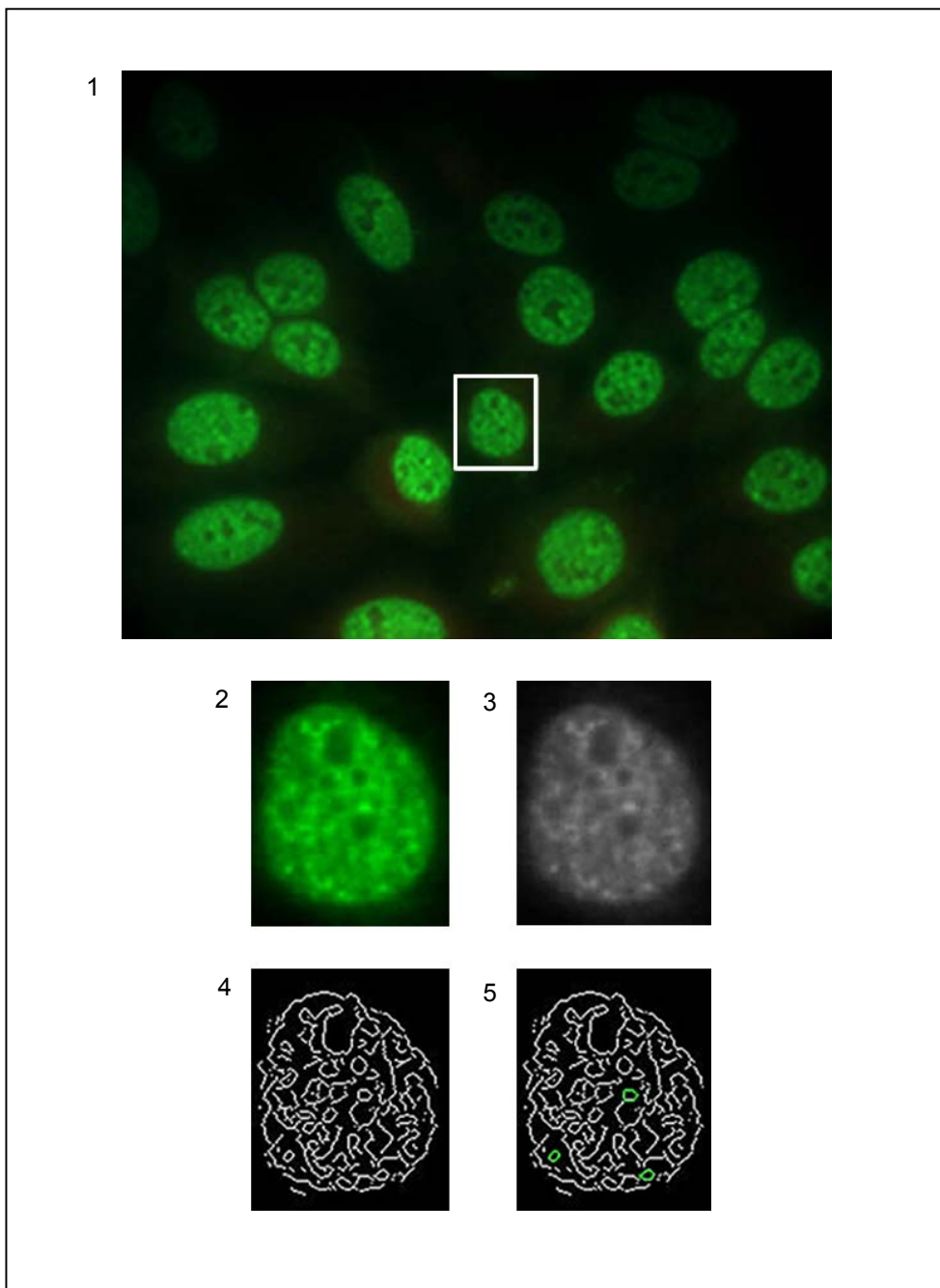


Figura 5. Imagem de imunofluorescência em FAN HEp-2 capturada por câmara acoplada em microscópio de fluorescência (1). Recorte de um núcleo celular da imagem original (2). Imagem processada pelo MatLab transformada em escala de cinza (3) e bordas delimitando os grânulos presentes no núcleo celular (4). Delimitação de três grânulos para medida da área pelo programa KS 300 (5).

### **3.5. Medida da área dos grânulos do padrão nuclear pontilhado grosso**

As medidas das superfícies (áreas) dos grânulos das amostras positivas para o padrão nuclear pontilhado grosso foram feitas manualmente, com o auxílio do software KS 300 (KONTRON ELEKTRONIK, Alemanha), a partir dos recortes das imagens capturadas das lâminas de imunofluorescência indireta.

### **3.6. Enzimaimunoensaio (ELISA) para detecção dos auto-anticorpos específicos**

A confirmação dos auto-anticorpos presentes nos padrões dos 59 soros, foi realizada pela técnica de enzimaimunoensaio (ELISA) (HEMAGEN, USA), que expressa a especificidade e a concentração do(s) auto-anticorpo(s) presente(s) nas amostras.

Na técnica de ELISA, os anticorpos presentes no soro do paciente ligam-se especificamente ao antígeno purificado (U1-RNP, Sm, SSA/Ro, SSB/La), fixado nas microcavidades da placa. Após a primeira lavagem, esses imunocomplexos permanecem aderidos na placa e um segundo anticorpo, conjugado à enzima peroxidase, liga-se aos anticorpos do paciente. Nas cavidades em que o conjugado permanece ligado, a enzima catalisa uma reação colorimétrica no substrato gerando um produto corado. A reação enzimática é bloqueada (após 10 minutos de reação) e a coloração amarelada é lida fotometricamente. A intensidade de cor gerada é proporcional à concentração do auto-anticorpo na amostra (Figura 6).

Os kits de enzimaimunoensaio utilizados para a detecção do auto-anticorpo específico apresentavam antígenos para Sm puro e Sm/RNP concomitantemente, desta forma não conseguimos separar os soros com auto-anticorpos anti-Sm isolados.

Em uma primeira etapa, foi realizada uma diluição de 1/26 das amostras selecionadas e dos controles positivo e negativo fornecidos pelo kit. Foram transferidos 100µL das amostras e controles em cada cavidade da placa, sendo que cada placa continha um antígeno específico (Sm, U1RNP, SSA/Ro ou SSB/La), e então esta foi incubada por 45 minutos à temperatura ambiente.

Após o período de incubação, as diluições foram desprezadas e as placas lavadas quatro vezes com jatos leves de solução de lavagem. Posteriormente, a placa foi invertida em papel absorvente para secagem.

Foram transferidos 100µL de conjugado (anticorpo de cabra anti-antígeno nuclear conjugado à enzima peroxidase) a cada microcavidade. Após incubação à temperatura ambiente (30 minutos), o procedimento de lavagem foi repetido. Em seguida, foram adicionados 100µL de substrato enzimático e realizada nova incubação de 10 minutos, à temperatura ambiente. Logo após, foram adicionados 50µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N para finalizar a reação enzimática. A leitura foi realizada imediatamente após o término da reação, em uma leitora de ELISA Micro Reader III (HYPERION, USA), utilizando filtro de 450nm.

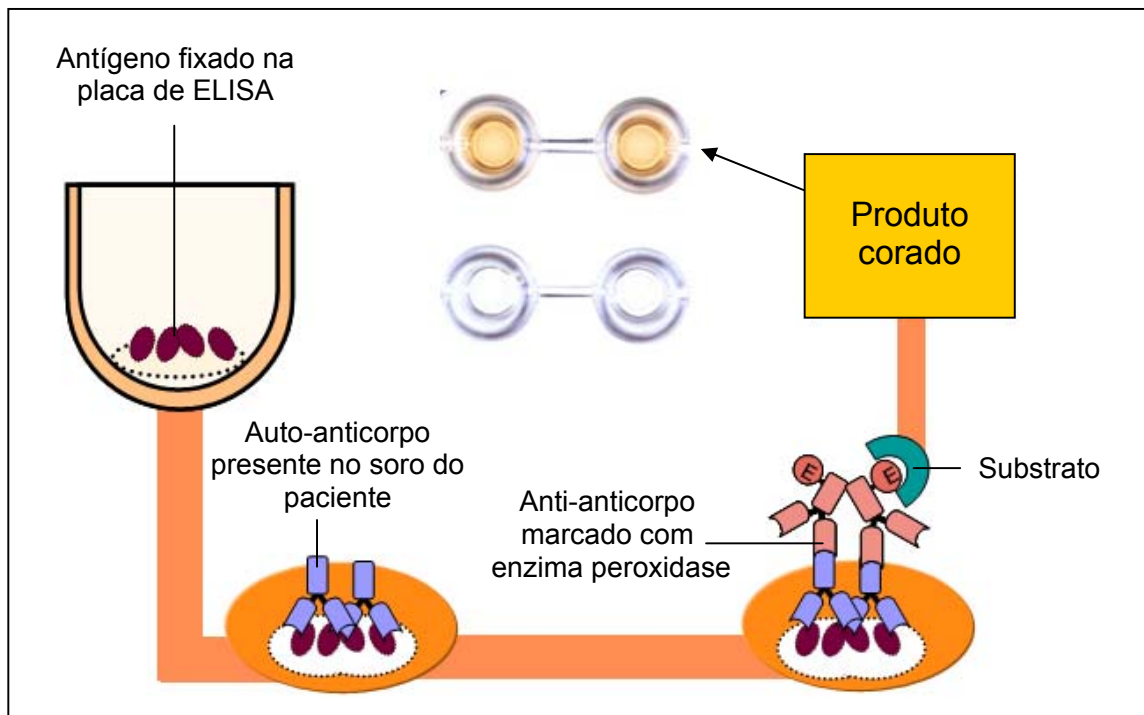


Figura 6. Técnica de enzimoensaio (ELISA).

#### 4. RESULTADOS

As 59 amostras de soro utilizadas foram divididas em três grupos: amostras com anticorpos anti-U1RNP (25 soros), amostras com anticorpos anti-Sm/U1RNP (17 soros) e amostras negativas para os anticorpos anti-Sm e anti-U1RNP, denominadas controle (17 soros). Foram medidas as áreas de 90 grânulos de cada amostra, perfazendo um total de 5310 grânulos medidos.

Os menores valores das áreas dos grânulos dos três grupos, anti-Sm/U1RNP, anti-U1RNP e controles foram  $25,4\mu^2$ ,  $27,2\mu^2$  e  $27,2\mu^2$  respectivamente. Os valores superiores variaram entre  $121,5\mu^2$  nas amostras Sm/U1RNP positivas e  $177\mu^2$  nos controles, conforme pode ser observado na Tabela 1.

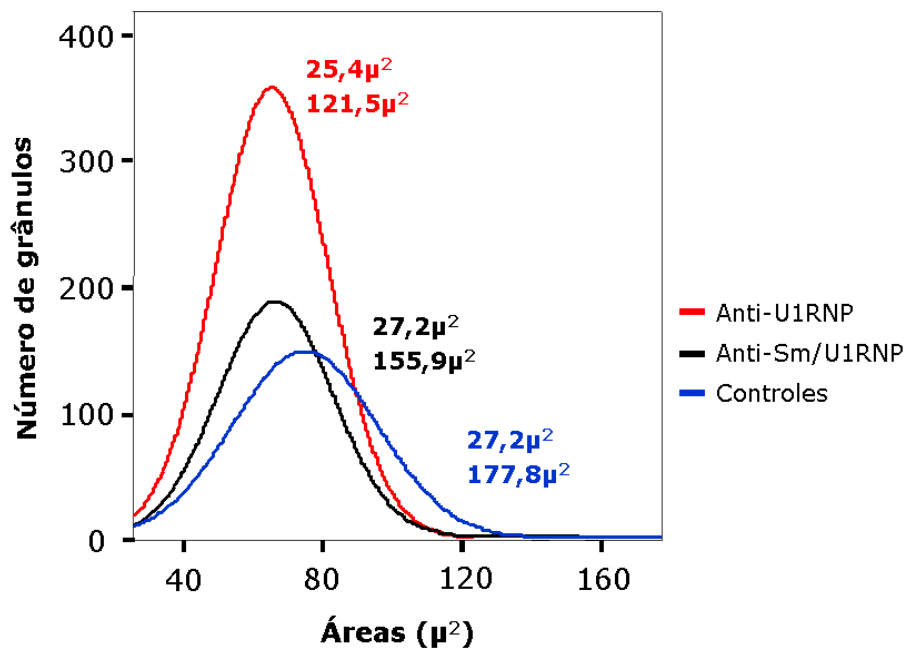
Tabela 1. Medidas das áreas dos menores e maiores grânulos e as médias de cada grupo de amostras.

Grupo de amostras	Menor grânulo	Maior grânulo	Médias
Sm/U1RNP	$25,4\mu^2$	$121,5\mu^2$	$66,1\mu^2$
U1RNP	$27,2\mu^2$	$155,9\mu^2$	$66,1\mu^2$
Controles	$27,2\mu^2$	$177,8\mu^2$	$74,9\mu^2$

Os grupos anti-Sm/U1RNP e anti-U1RNP apresentaram os valores das medidas das áreas dos grânulos entre  $25,4\mu^2$  e  $155,9\mu^2$  (Tabela 1 e Figura 1), além de possuírem a mesma média ( $66,1\mu^2$ ) (Tabela 1). Por essa razão estes dois grupos foram reduzidos a apenas um grupo, denominado não-controle. Desta forma foram trabalhados dois grupos diferentes, um grupo controle (negativo para ambos os

anticorpos: anti-Sm/U1RNP e anti-U1RNP) e um não-controle (anti-Sm/U1RNP e anti-U1RNP positivos).

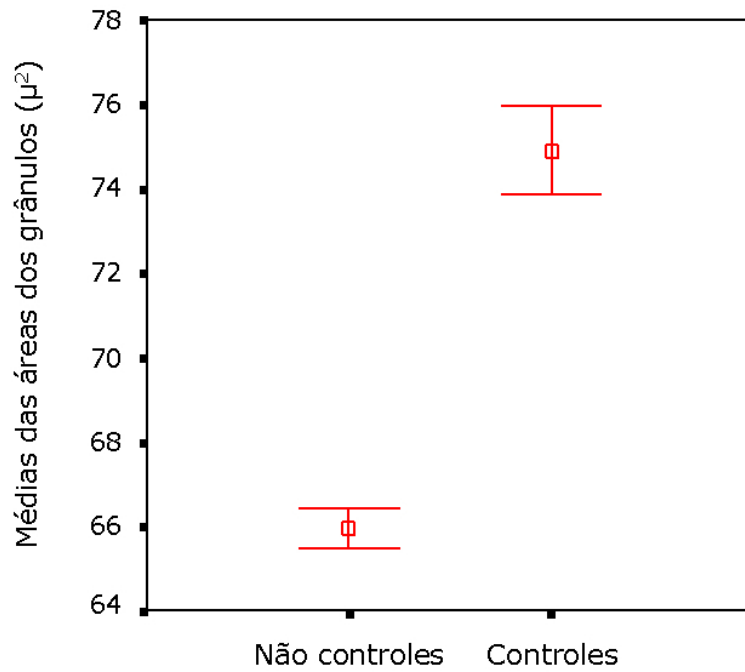
Figura 1. Valores máximo e mínimo das medidas das áreas dos grânulos dos grupos anti-U1RNP, anti-Sm/U1RNP e controles e número de grânulos com cada medida.



O grupo controle também apresentou valores de áreas semelhantes ao grupo não controle, porém a média foi significativamente diferente (Figura 2).

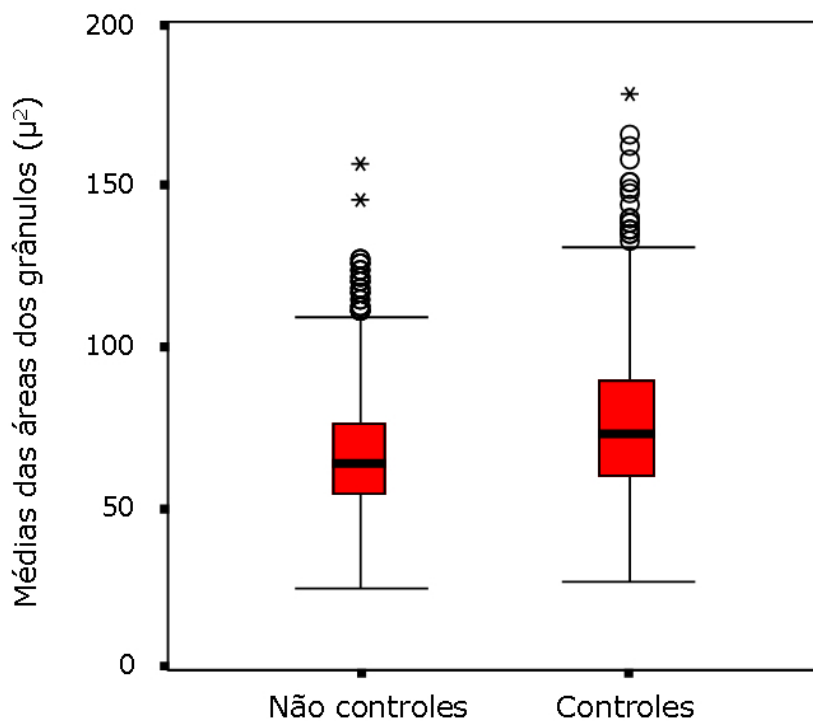


Figura 2. Médias dos valores das medidas das áreas dos grânulos dos grupos não controles e controles.



As médias das medidas dos grânulos dos grupos de amostras positivas para os auto-anticorpos anti-Sm/U1RNP e anti-U1RNP e controles estão demonstrados na Figura 3.

Figura 3. Médias das medidas das áreas dos grânulos dos grupos não controles e dos controles.



## 5. DISCUSSÃO

Atualmente, a imunofluorescência indireta em células HEp-2 (FAN HEp-2) é o teste de escolha para a pesquisa de auto-anticorpos. Este é um teste sensível, capaz de detectar anticorpos mesmo em pequenas quantidades. No entanto, ele se torna subjetivo no momento em que o resultado é dado a partir de uma leitura visual, dependendo da experiência do observador, além de outros fatores como o microscópio e o substrato utilizado (Dellavance *et al*, 2003).

Ao se observar uma lâmina de imunofluorescência indireta em células HEp-2 consegue-se identificar o padrão nuclear pontilhado grosso, mas não se pode determinar o auto-anticorpo presente. Esta identificação é de grande importância, pois de acordo com o auto-anticorpo (anti-Sm ou anti-U1RNP) as suspeitas clínicas são diferentes, tornando muito importante a identificação exata do auto-anticorpo.

Segundo Pfrimer *et al* (2001) alguns padrões são de fácil determinação, pois apresentam características bem peculiares e são específicos para determinado auto-anticorpo. Outros, como o padrão nuclear pontilhado grosso, podem suscitar dúvidas quanto ao aspecto dos grânulos, podendo ser confundido com o padrão nuclear pontilhado fino. Nestes casos, faz-se necessária a realização de exames complementares a fim de se determinar a especificidade do auto-anticorpo presente no padrão nuclear pontilhado grosso ou pontilhado fino, os quais estão, respectivamente, associados aos auto-anticorpos anti-Sm ou anti-U1RNP e anti-SSA/Ro ou anti-SSB/La. Bridges *et al* (1996) afirmam que a determinação do auto-anticorpo pode ser obtida através de várias técnicas, sendo que a mais utilizada é a técnica de enzimaímmunoensaio (ELISA).

Testes complementares usados para a determinação da especificidade do anticorpo aumentam, sensivelmente, seus custos. A determinação precisa a partir da análise computacional auxiliaria tanto o clínico, que receberia um laudo mais rápido, quanto o paciente, que receberia um tratamento imediato e adequado. Além disso, o laudo deixaria de ser visual e passaria a ser representado de forma digital.

O FAN, além de sensível, é hoje considerado teste de triagem para a maioria das doenças auto-imunes, principalmente no que se refere às doenças reumáticas autoimunes como o lúpus eritematoso sistêmico, doença sistêmica crônica, podendo ser incapacitante e até mesmo de curso fatal. Conseqüentemente, técnicas que possam contribuir para uma melhor e mais rápida determinação da presença do auto-anticorpo, com maior especificidade, seriam de grande utilidade.

Dentre os padrões de fluorescência em FAN-HEp2, o padrão nuclear pontilhado grosso é o que mais se correlaciona com um diagnóstico preciso de LES, visto que pode refletir a presença do auto-anticorpo anti-Sm, específico para essa doença (Hiepe *et al*, 2002).

Em uma tentativa de contribuir para uma maior objetividade e especificidade do teste de FAN-HEp2, nos interessamos pela avaliação das medidas das áreas dos grânulos do padrão nuclear pontilhado grosso, a partir de um método informatizado.

Todas as amostras utilizadas apresentaram títulos iguais ou superiores a 320 e foram negativas para os auto-anticorpos anti-SSA/Ro e anti-SSB/La, que correspondem ao padrão nuclear pontilhado fino.

Por meio da análise dos resultados, conseguimos demonstrar que os 5310 grânulos medidos apresentaram áreas entre  $25,4\mu^2$  e  $177,8\mu^2$ , caracterizando o padrão nuclear pontilhado grosso. As análises dos resultados demonstraram que o padrão nuclear pontilhado grosso, positivo para os anticorpos anti-U1RNP e anti-Sm/U1RNP, apresenta grânulos compreendidos entre  $25,4\mu^2$  e  $155,9\mu^2$ , sendo que grânulos com valores acima de  $155,9\mu^2$  relacionam - se provavelmente a anticorpos ainda não identificados.

No padrão nuclear pontilhados grosso encontramos auto-anticorpos anti-Sm, anti-U1RNP ou ainda outros auto-anticorpos não bem definidos (Cook, 1998). Assim como Nyman *et al* (1986) e Ringertz *et al* (1986), não conseguimos observar, a partir da imagem da lâmina de IFI e da análise digital desta, diferença entre o padrão formado pelos auto-anticorpos anti-Sm e anti-U1RNP. Estes se mostraram visualmente idênticos.

A partir dos resultados deste trabalho e estudos posteriores em outras instituições, os valores das áreas dos grânulos do padrão nuclear pontilhado grosso poderá ser padronizado, permitindo assim a análise da imagem da lâmina de IFI para a liberação do laudo do FAN e seu possível auto-anticorpo. Juntamente com a clínica do paciente, o diagnóstico e conseqüentemente, a terapêutica, seriam mais rápidos e precisos.

Outro dado de interesse na avaliação das medidas dos grânulos seria correlacionarmos os valores obtidos, tanto dos soros controles quanto os não controles, ao diagnóstico clínico do paciente que fornecera a amostra do soro, o que traria uma maior especificidade ao resultado obtido.

No mais, seria interessante realizarmos a pesquisa de auto-anticorpos anti-Sm puros, o que não foi possível na nossa pesquisa, diante da dificuldade em se obter este anticorpo.

Estudos posteriores, com uma casuística maior, baseados em amostras de diferentes centros, se fazem necessários para que se possa confirmar os dados aqui obtidos e validar este método de estudo.

## 6. CONCLUSÕES

1. A partir das medidas das áreas dos grânulos das amostras de nossa casuística, no substrato utilizado, observamos que o padrão nuclear pontilhado grosso compreende grânulos com valores entre  $25,4\mu^2$  e  $177,8\mu^2$ .
2. Amostras com grânulos com áreas inferiores a  $25,4\mu^2$  têm 0,72% de probabilidade de serem nucleares do tipo pontilhado grosso.
3. Amostras com grânulos com áreas superiores a  $155,9\mu^2$  podem ser do tipo nuclear pontilhado grosso, porém apresentam negatividade para os auto-anticorpos anti-Sm e anti-U1RNP.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abu-Shakra M. & Schoenfeld Y. What are natural autoantibodies? In: Schoenfeld Y., Isenberg D. A., eds. *Natural autoantibodies: their physiological role and regulatory significance*, Boca Raton: CRC Press, pp. 15-33, 1993.
2. Adams B. B. & Mutasim D. F. The diagnostic value of anti-nuclear antibody testing. *Internat J Dermatol* 39:887-91, 2000.
3. Andrade L. E. C., Medeiros K. X., Oliveira R. M. Evolução e mudança de paradigma nos métodos laboratoriais para identificação de auto-anticorpos. *Rev Bras Reumatol* 38(5):259-63, 1998.
4. Arbuckle M. R., McClain M. T., Rubertone M. V., Scofield R. H., Dennis G. J., James J. A., Harley J. B. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 349(16):1526-33, 2003.
5. Bridges A. J., Lorden T. E., Havighurst T. C. Autoantibody testing for connective tissue diseases. *Immunopathology* 108:406-10, 1996.
6. Buyon J. P. & Winchester R. Congenital complete heart block. A human model of passively acquire autoimmune injury. *Arthritis Rheum* 33:609-14, 1990.
7. Bylund D. J. & Nakamura R. M. Importance of detections of SSA/Ro autoantibody screening immunofluorescence tests for autoantibodies to nuclear antigens. *J Clin Lan Anal* 5:212-7, 1991.
8. Carson D. A. Genetic factors in the etiology and pathogenesis of autoimmunity. *FASEB J* 6:2800-5, 1992.

9. Chan E. K. & Tan E. M. Epitopic targets for autoantibodies in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 1:376-80, 1989.
10. Cohen I. R. & Cooke A. Natural autoantibodies might prevent autoimmune disease. *Immunol Today* 7:363-4, 1986.
11. Cook L. Short analytical review. New methods for detection of anti-nuclear antibodies. *Clin Immunol Immunopathol* 88:211-220, 1998.
12. Dahle C., Skogh T., Aberg A. K., Jalal A., Olcén P. Methods of choice for diagnostic antinuclear antibody (ANA) screening. Benefit of adding antigen-specific assays to immunofluorescence microscopy. *J Autoimmunity* 22:241-248, 2004.
13. Dellavance, A., Gabriel Júnior A., Cintra A. F. U., Ximenes A. C., Nuccitelli B., Taliberti B. H., Moreira C., von Mühlen C. A., Bichara C. D., Santos C. H. R., Yano C. M., Manguiera C. L. P., Carvalho D. G., Bonfá E. S. D. O., Doi E. M., Guimarães F. N. C., Araújo F. I., Mundim H. M., Rego J., Vieira L. E. A., Poli L., Andrade L. E. C., Callado M. R., Mesquita M. M., Sugiyama M., Silhessarenko N., Silva N. A., Carballo O. G., Leser P. G., Francescantonio P. L. C., Jarach R., Xavier R. M., Levy R. A., Neves S. P. F., Cruvinel W. M., Santos W. S. II Consenso brasileiro de FAN HEp-2. *Rev Bras Reumatol* 43(3):129-40, 2003.
14. de Vlam K., de Keyser F., Verbruggen G, et al. Detection and identification of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Clin Exp Rheumatol* 11(4):393-7, 1993.
15. Egner W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. *J Clin Pathol* 53:424-32, 2000.



16. Evans J. Antinuclear antibody testing in systemic autoimmune disease. *Clin Chest Med* 19:613-25, 1998.
17. Feltkamp, T. E. Antinuclear antibody determination in a routine laboratory. *Ann Rheum* 40:1601-11, 1997.
18. Fernandez S. A. V., Lobo A. Z. C., Oliveira Z. N. P. O., Fukumori L. M. I., Perigo A. M., Rivitti E. A. Prevalence of antinuclear autoantibodies in the serum of normal blood donors. *Rev Hosp Clin Fac Med S Paulo* 58(6):315-19, 2003.
19. Gordon P., Rosenthal E., Simpson J. M., Sharland G., Brucato A., Franceschini D., De Bosschere K., Meheus L., Meroni P. L. Hughes G. R., Buyon J. Anti-52 kDa Ro, anti-60 kDa Ro, and anti-La antibody profiles in neonatal lupus. *J Rheumatol* 31(12):2480-4, 2004.
20. Hang L. & Nakamura R. M. Current concepts and advances in clinical laboratory testing for autoimmune diseases. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 34:275-311, 1997.
21. Hargraves M. M., Richmond H., Morton R. Presentation of two bone marrow elements: "tart" cell and "LE" cell. *Proceed Mayo Clin* 23:25-8, 1948.
22. Harmon C. E., Deng J. S., Peebles C. L., Tan E. M. The importance of tissue substrate in the SSA/Ro antigen-antibody system. *Arthritis Rheum* 27:166-73, 1984.
23. Hawkins B. K. Autoantibodies in an Australian population. I. Prevalence and persistence. *J Clin Lab Immunol* 2:211-15, 1979.

24. Hiepe F., Dorner T., Burmester G. Antinuclear antibody and extractable nuclear antigen-related diseases. *Int Arch Allergy Immunol* 123-25, 2000.
25. Hiepe F., Riemekasten G., von Mikecz A. Anti-Sm antibodies marker antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). *J Rheumatol* 61:306-7, 2002.
26. Hietarinta M. & Lassila O. Clinical significance of antinuclear antibodies in systemic rheumatic diseases. *Ann Int Med* 28:283-91, 1996.
27. Hochberg M. C. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 40:17-25, 1997.
28. Hoffman I. E. A., Peene I., Meheus L., Huizinga T. W. J., Cebecauer L., Isenberg D., De Bosschere K., Hulstaert F., Veys E. M., De Keyser D. Specific antinuclear antibodies are associated with clinical features in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 63:1155-8, 2004.
29. Holborow E. J., Weir D. M., Johnson G. D. A serum factor in lupus erythematosus with affinity for tissue nuclei. *Br Med J* 2:732, 1957.
30. Hooper B. Autoimmunity in rural community. *Clin Exp Immunol* 12:79-87, 1992.
31. Jacobson D. L., Gange S. J., Rose M. R., Graham N. M. H. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 84:223-43, 1997.

32. Kavanaugh A., Tomar R., Reveille J., Solomon D. H., Homburger H. A. Guidelines for clinical use of the antinuclear antibody test and tests for specific autoantibodies to nuclear antigens. *Arch Pathol Lab Med* 124:71-81, 2000.
33. Kiuttu J., Hartikainen A. L., Makitalo R., Ruuska P. The outcome of pregnancy in antinuclear antibody-positive women. *Gynecol Obstet Invest* 37:160-3, 1994.
34. Lernmark A. Autoimmune diseases: are markers ready for prediction? *J Clin Invest* 108:1091-6, 2001.
35. Lopez-Longo F. J., Monteagudo I., Gonzalez C. M., Grau R., Carreno L. Systemic lupus erythematosus: clinical expression and anti-Ro/Ssa response in patients with and without lesions of subacute cutaneous lupus erythematosus. *Lupus* 6(1):32-9, 1997.
36. Nakamura R. M. & Tan E. M. Recent advances in laboratory tests and the significance of autoantibodies to nuclear antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin Lab Med* 6:41-53, 1986.
37. Nakamura E. M. & Tan E. M. Update on autoantibodies to intracellular antigens in systemic rheumatic diseases. *Clin Lab Med* 12:1-23, 1992.
38. Nakamura R. M., Bylund D. J., Tan E. M. Current status of available standards for quality improvement of assays for detection of autoantibodies to nuclear and intracellular antigens. *J Clin Lab Anal* 8:360-8, 1994.
39. Nyman U., Hallman Y., Hadlaczky G., Pettersson S., Sharp G., Ringertz N.R. Intranuclear localization of snRNP antigens. *J Cell Biol* 102:137-44, 1986.
40. Pardini R. Laboratório nas doenças reumáticas. In: Reumatologia. Diagnóstico e Tratamento, 2ª ed., Medsi ed., Rio de Janeiro, 2001, pp. 786.

41. Pfrimer, I. A. H., Francescantonio P. L. C., von Mühlen C. A., Dellavance A., Gabriel Júnior A., Cintra A. F. U., Ximenes A. C., Nuccitelli B., Bichara C. D., Yano C., Carvalho D. G., Bonfá E. S. D. O., Mundim H. M., Rego J., Andrade L. E. C., Mesquita M. M., Santiago M. B., Silva N. A., Miranda P. J. I., Leser P., Jarach R., Levy R. A., Neves S. P. F., Cruvinel W. M., Santos W. S. I. Consenso nacional para a padronização dos laudos de FAN em células HEp-2. *Rev Bras Reumatol* 41:267-73, 2001.
42. Provost T. & Reichlin M. Immunopathologic studies of cutaneous lupus erythematosus. *J Clin Immunol* 8:223-7, 1988.
43. Reichlin M. & van Venrooij W. J. Autoantibodies to the URNP particles: relationship to clinical diagnosis and nephritis. *Clin Exp Immunol* 83:286-90, 1991.
44. Retig R. A. & Levinsky N. G. Kidney failure and the federal government. Washington DC: National Academy Press, 1991.
45. Ringertz N. R., Hadlaczky G., Hallman H., Nyman U., Pettersson I., Sharp G. C. Computer analysis of the distribution of nuclear antigens: studies on the spatial and functional organization of the interphase nucleus. *J Cell Sci Suppl* 4:11-28, 1986.
46. Roitt I., Jonathan B., Male D. *Imunologia*, 2. ed., São Paulo: Manole, pp. 25.13, 1992.
47. Sack U., Knoechner S., Warschkau H., Pigla U., Emmrich F., Kamprad M. Computer-assisted classification of Hep-2 immunofluorescence patterns in autoimmune diagnostics. *Autoimmunity Reviews* 2:298-304, 2003.

48. Sontheimer R. D., McCauliffe D. P., Zappi E., Targoff I., Antinuclear antibodies: clinical correlations and biologic significance. *Adv Dermatol* 7:3-52, 1991.
49. Tan E. M., Cohen A. S., Fries J. F., Masi A. T., McShane D. J., Rothfield N. F., Schaller J. G., Talal N., Winchester R. J. Special article: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-7, 1982.
50. Tan E. M. Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune disease and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44:93-151, 1989.
51. Tan E. M., Feltkamp T. E. W., Smolen J. S., Butcher B., Dawkins R., Fritzler M. J., et al. Range of antinuclear antibodies in healthy individuals. *Arthritis Rheum* 40:1601-11, 1997.
52. Tosato G., Steinberg A. D., Yarchoan R., Heilman C. A. Abnormally elevated frequency of Epstein-Barr virus-infected B-cells in the blood of patients with Rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 73:1789, 1984.
53. Ulvestad, E., Kanestrom, A., Madland, T. M., Thomassen, E., Haga, H. J., Vollset, S. E. Evaluation of diagnostic tests for antinuclear antibodies in rheumatological practice. *Scand J Immunol* 52: 309-15, 2000.
54. Vilar M. J. P. & Sato E. I. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in tropical region. *Lupus* 11:528-32, 2002.
55. von Mühlen C. A. & Tan E. M. Autoantibody specificities in autoimmune rheumatic diseases. *Rev Bras Reumatol*, 34:173, 1994.

56. Wallace D. J & Hahn B. H. Dubois' Lupus Erythematosus, Londres: Lea & Fabinger, pp.955, 1993.
57. Wanchu A. Antinuclear antibodies: clinical applications. *J Postgrad Med* 46:144-8, 2000.
58. Ward M. M. Laboratory testing for systemic rheumatic diseases. *Post Grad Med* 103:93-100, 1998.
59. Wenzel J., Gerdson R., Uerlich M., Bauer R., Bieber T., Boehn I. Antibodies targeting extractable nuclear antigens: Histological development and current knowledge. *British J Dermatol* 145:859-67, 2001.
60. Wunder P. R. Doenças auto-imunes. In: Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e auto-imunes, Ferreira A. V. & Ávila S. L. M. eds., 2. ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., pp. 414-430, 2001.
61. Xavier R. M., Yamauchi Y., Nakamura M., et al. Antinuclear antibodies in healthy aging people: a prospective study. *Mech Ageing Dev* 78:145-54, 1995.
62. Youinou P., Buskila D., Mackenzie E. et al. CD5+ B cells and disease. In: Natural autoantibodies: their physiological role and regulatory significance, Schoenfeld Y., Isenberg D. A., eds., Boca Raton: CRC Press, pp.143-158, 1993.
63. Zweiman B. & Lisak R.P. Autoantibodies: autoimmunity and immune complexes. In: Henry JB, ed. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 18th ed. Pp. 885-911. Philadelphia: W.B. Saunders, 1991.

# **ANEXOS**

**Medidas das áreas dos grânulos das amostras Sm/U1RNP positivas (n=17)**

<b>pg 3</b>	<b>pg 16</b>	<b>soro 18</b>	<b>soro 19</b>	<b>soro 21</b>	<b>soro 27</b>
52,6022	70,7409	59,8577	59,8577	65,2993	58,0438
68,9271	65,2993	54,4161	94,3213	90,6935	56,23
50,7884	67,1132	81,6242	68,9271	74,3687	32,6497
87,0658	48,9745	72,5548	54,4161	63,4855	54,4161
50,7884	77,9964	77,9964	83,438	108,832	56,23
54,4161	59,8577	68,9271	81,6242	54,4161	63,4855
41,719	87,0658	65,2993	63,4855	61,6716	41,719
58,0438	67,1132	63,4855	79,8103	67,1132	77,9964
45,3468	87,0658	81,6242	81,6242	56,23	30,8358
87,0658	67,6716	58,0438	65,2993	48,9745	34,4635
72,5548	72,5548	74,3687	76,1826	61,6716	54,4161
101,577	81,6242	70,7409	76,1826	105,204	43,5329
72,5548	76,4826	61,6716	79,8103	59,8577	43,5329
110,646	59,8577	67,1132	58,0438	41,719	63,4855
63,4855	52,6022	50,7884	68,9271	47,1606	45,3468
67,1132	72,5548	79,8103	77,9964	63,4855	61,6716
72,5548	79,8103	52,6022	47,1606	56,23	45,3468
83,438	59,8577	58,0438	76,1826	56,23	45,3468
70,7409	99,7629	59,8577	77,9964	74,3687	52,6022
56,23	61,6716	105,204	63,4855	41,719	56,23
85,2519	92,5074	99,7629	50,7884	48,9745	54,4161
47,1606	43,5329	70,7409	85,2519	56,6022	65,2993
43,5329	61,6716	59,8577	61,6719	63,4855	67,1132
61,6716	67,1132	74,3687	94,3213	50,7884	39,0913
27,2081	52,6022	107,018	79,8103	56,23	45,3468
65,2993	72,5548	105,204	45,3468	65,2993	70,7409
65,2993	74,3687	77,9964	56,23	90,6935	74,3687
54,4161	68,9271	70,7409	96,1351	72,5548	97,949
47,1606	54,4161	63,4855	81,6242	79,8103	63,4855
48,9745	45,3468	67,1132	68,9271	96,1351	43,5329
54,4161	43,5329	92,5074	47,1606	48,9745	45,3468
56,23	63,4855	87,0658	58,0438	85,2519	68,9271
77,9964	61,6716	76,1826	90,6935	74,3687	67,1132
76,1826	47,1606	72,5548	76,1826	67,1132	56,23
83,438	50,7884	45,3468	45,3468	48,9745	45,3468
59,8577	45,3468	65,2993	48,9745	107,018	50,7884
94,3213	58,0438	63,4855	85,2519	65,2993	101,577
76,1826	43,5329	72,5548	83,438	58,0438	61,6716
87,0658	58,0438	74,3687	50,7884	76,1826	65,2993
81,6242	47,1606	72,5548	92,5074	87,0658	43,5329
61,6716	38,0913	59,8577	87,0658	88,8796	56,23
52,6022	52,6022	67,1132	85,2519	48,9745	76,1826
92,5074	52,6022	58,0438	105,204	52,6022	59,8577
88,8796	48,9745	54,4161	67,1132	63,4855	63,4855
79,8103	77,9964	68,9271	85,2519	88,8796	52,6022
74,3687	34,4635	76,1826	43,5329	67,1132	56,23



107,018	54,4161	72,5548	83,438	50,7884	36,2774
72,5548	48,9745	36,2774	52,6022	48,9745	47,1606
70,7409	41,719	68,9271	87,0658	63,4855	58,0438
61,6716	45,3468	52,6022	59,8577	74,3687	47,1606
59,8577	38,0913	58,0438	56,23	45,3468	70,7409
88,8796	59,8577	47,1606	74,3687	56,23	63,4855
76,1826	48,9745	67,1132	59,8577	52,6022	83,438
68,9271	30,8358	61,6716	65,2993	58,0438	67,1132
85,2519	65,2993	52,6022	70,7409	70,7409	59,8577
76,1826	67,1132	67,1132	59,8577	83,438	112,46
61,6716	43,5329	68,9271	61,6716	74,3687	101,577
59,8577	56,23	43,5329	45,3468	65,2993	45,3468
63,4855	63,4855	65,2993	45,3468	36,2774	56,23
77,9964	48,9745	68,9271	47,1606	58,0438	70,7409
70,7409	52,6022	85,2519	58,0438	41,719	72,5548
59,8577	34,4635	83,438	88,8796	39,9051	54,4161
54,4161	47,1606	77,9964	65,2993	72,5548	52,6022
114,274	65,2993	48,9745	76,1826	61,6716	74,3687
77,9964	59,8577	87,0658	77,9964	74,3687	63,4855
59,8577	77,9964	39,9051	94,3213	58,0438	59,8577
116,088	79,8103	41,719	65,2993	48,9745	32,6497
72,5548	45,3468	99,7629	54,4161	87,0658	77,9964
88,8796	52,6022	99,7629	83,438	63,4855	52,6022
79,8103	41,719	63,4855	85,2519	79,8103	39,9051
43,5329	52,6022	70,7409	76,1826	45,3468	85,2519
70,7409	54,4161	85,2519	77,9964	68,9271	76,1826
61,6716	52,6022	74,3687	79,8103	48,9745	50,7884
47,1606	88,8796	65,2993	54,4161	61,6716	34,4635
41,719	48,9745	74,3687	67,1132	63,4855	68,9271
63,4855	45,3468	83,438	67,1132	77,9964	41,719
47,1606	67,1132	103,391	36,2774	54,4161	81,6242
58,0438	58,0438	59,8577	50,7884	63,4855	70,7409
70,7409	43,5329	61,6716	76,1826	77,9964	67,1132
70,7409	43,5329	101,577	108,832	54,4161	56,23
67,1132	52,6022	70,7409	67,1132	70,7409	72,5548
70,7409	90,6935	92,5074	79,8103	90,6935	92,5074
50,7884	76,1826	65,2993	48,9745	58,0438	52,6022
56,23	70,7409	54,4161	79,1829	63,4855	90,6935
67,1132	39,9051	83,438	96,1351	52,6022	56,23
70,7409	58,0438	54,4161	58,0438	63,4855	81,6242
67,1132	47,1606	65,2993	50,7884	72,5548	48,9745
43,5329	61,6716	85,2519	45,3468	77,9964	72,5548
63,4855	68,9271	68,9271	59,8577	54,4161	70,7409
83,4838	59,8577	41,719	63,4855	70,7409	65,2993

<b>soro 39</b>	<b>soro 43</b>	<b>soro 49</b>	<b>P 1</b>	<b>P 2</b>	<b>soro 154</b>
67,1132	74,3687	52,6022	85,2519	99,7629	39,2774
54,4161	59,8577	52,6022	70,7409	94,3213	43,5329
70,7409	76,1826	48,9745	56,23	90,6935	41,719
90,6935	67,1132	72,5548	96,1351	99,7629	63,4855
45,5329	59,8577	81,6242	90,6935	94,3213	50,7884
58,0438	52,6022	70,7409	79,8103	70,7409	36,2774
54,4161	59,8577	58,0438	99,7629	70,7409	54,4161
74,3687	77,9964	72,5548	68,9271	68,9271	79,8103
70,7409	76,1826	61,6716	77,9964	76,1826	59,8577
63,4855	76,1826	103,391	56,23	74,3687	76,1826
103,391	83,438	94,3213	85,2519	88,8796	52,6022
103,391	76,1826	81,6242	38,0913	74,3687	45,3468
79,8103	65,2993	54,4161	79,8103	72,5548	50,7884
88,8796	87,0658	54,4161	67,1132	90,6935	63,4855
38,0913	87,0658	61,6716	76,1822	81,6242	63,4855
58,8577	72,5548	79,8103	87,0658	58,0438	48,9745
90,6935	59,8577	72,5548	67,1132	70,7409	107,018
67,1132	48,9745	65,2993	77,9964	67,1132	87,0658
81,6242	56,23	94,3213	99,7629	105,204	54,4161
47,1606	63,4855	77,9964	76,1826	90,6935	92,5074
56,23	72,5548	72,5548	63,4855	103,391	61,6716
50,7884	56,23	54,4161	50,7884	99,7629	61,6716
59,8577	54,4161	77,9964	43,5324	96,1351	72,5548
63,4855	54,4161	65,2993	52,6022	110,646	63,4855
67,1132	70,7409	94,3213	67,1132	88,8796	38,0913
45,3468	50,7884	65,2993	56,23	96,1351	41,719
54,4161	54,4161	88,8796	68,9271	92,5074	65,2993
74,3687	58,0438	99,7629	79,8103	114,274	65,2993
36,2774	56,23	85,2519	79,8103	97,949	29,0219
36,2774	52,6022	83,438	72,5548	112,44	74,3687
72,5548	90,6936	83,438	63,4855	92,5074	48,9745
67,1132	107,018	67,1132	67,1132	94,3213	83,438
61,6716	83,438	77,9964	59,8577	79,8103	56,23
54,4161	58,0438	61,6716	79,8103	72,5548	59,8577
39,9051	76,1826	52,6022	74,3687	65,2993	50,7884
56,23	85,2519	48,9745	72,5548	67,1132	54,4161
47,1606	47,1606	50,7884	56,23	81,6242	34,4635
90,6935	79,8103	72,5548	70,7409	77,9964	43,5329
59,8577	50,7884	48,9745	63,4855	79,8103	52,6022
88,8796	56,23	56,23	81,6242	83,438	61,6716
76,1826	68,9271	34,4635	74,3687	83,438	74,3687
50,7884	63,4855	50,7884	99,7629	83,438	65,2993
61,6716	79,8103	52,6022	61,672	81,6242	61,6716
87,0658	76,1826	72,5548	70,7409	72,5548	67,1132
63,4855	54,4161	70,7409	68,9271	61,6716	58,0438
59,8577	36,2774	70,7409	63,4855	85,2519	70,7409
79,8103	59,8577	67,1132	61,6716	63,4855	63,4855
56,23	79,8103	79,8103	48,9745	87,0658	67,1132

56,23	54,4161	88,8796	63,4855	81,6242	58,0438
81,6242	38,0913	94,3213	61,6716	81,6242	56,23
76,1826	59,8577	81,6242	52,6022	90,6935	47,1606
59,8577	38,0913	74,3687	68,9271	70,7409	68,9271
68,9271	72,5548	119,715	72,5548	36,2774	67,1132
39,9051	70,7409	74,3687	58,0438	58,0438	61,6716
34,4635	61,6716	101,577	67,1132	63,4855	74,3687
52,6022	43,5329	83,438	65,2993	83,438	43,5329
48,9745	54,4161	83,438	67,1132	48,9745	34,4635
48,9745	63,4855	101,577	63,4855	97,949	56,23
94,3213	50,7884	81,6242	77,9964	63,4855	68,9271
77,9964	58,0438	76,1826	85,2519	52,6022	74,3687
67,1132	58,0438	81,6242	81,6242	92,5074	48,9745
61,6716	45,3468	77,9964	76,1826	105,204	36,2774
70,7409	85,2519	94,3213	88,8796	88,8796	43,5329
58,0438	81,6242	70,7409	74,3687	79,8103	54,4161
50,7884	76,1826	48,9745	72,5548	59,8577	45,3468
76,1826	52,6022	72,5548	65,2993	81,6242	81,6242
88,8796	59,8577	52,6022	67,1132	56,23	56,23
83,438	56,23	79,8103	65,2993	70,7409	70,7409
67,1132	79,8103	103,391	58,0438	63,4855	83,438
63,4855	88,8796	74,3687	61,6716	56,23	76,1826
74,3687	87,0658	87,0658	70,7409	67,1132	77,9964
61,6716	39,9051	79,8103	61,6716	90,6835	83,438
47,1606	50,7884	68,9271	63,4855	92,5074	56,23
48,9745	45,3468	90,6935	72,5548	85,2519	59,8577
50,7884	79,8103	88,8796	76,1826	74,3687	72,5548
45,3468	54,4161	121,529	48,9745	50,7884	52,6022
56,23	54,4161	92,5074	43,5329	59,8577	59,8577
52,6022	65,2993	87,0658	52,6022	59,8577	63,4855
59,8577	52,6022	101,577	70,7409	81,6242	41,719
52,6022	41,719	92,5074	76,1826	97,949	70,7409
54,4161	61,6716	72,5548	97,949	81,6242	65,2993
77,9964	92,5074	65,2993	67,1132	88,8796	45,3468
72,5548	59,8577	61,6716	72,5548	56,23	47,1606
58,0438	68,9271	72,5548	58,0438	52,6022	58,0438
50,7884	59,8577	94,3213	52,6022	56,23	54,4161
74,3687	58,0438	90,6935	90,6935	72,5548	43,5329
52,6022	65,2993	70,7409	77,9964	72,5548	85,2519
72,5548	63,4855	48,9745	63,4855	70,7409	38,0913
70,7409	79,8103	70,7409	79,8103	56,23	65,2993
72,5548	72,5548	79,8103	48,9745	72,5548	85,2519

<b>soro 155</b>	<b>soro 157</b>	<b>soro 161</b>	<b>soro 163</b>	<b>soro 165</b>
38,0913	54,4161	85,2519	67,1132	61,6716
76,1826	47,1606	54,4161	67,1132	61,6716
74,3687	52,6022	54,4161	68,9271	63,4855
39,9051	70,7409	43,5329	48,9745	65,2993
67,1132	50,7884	48,9745	65,2993	87,0658
68,9271	61,6716	48,9745	94,3213	50,7884
54,4161	52,6022	65,2993	61,6716	94,3213
52,6022	67,1132	56,23	90,6935	61,6716
43,5329	52,6022	61,6716	58,0438	77,9964
48,9745	34,4635	79,8103	85,2519	88,8796
61,6716	59,8577	50,7884	85,2519	81,6242
59,8577	41,719	56,23	54,4161	107,018
59,8577	54,4161	67,1132	77,9964	48,9745
45,3468	45,3468	68,9271	72,5548	77,9964
56,23	52,6022	70,7409	48,9745	87,0658
81,6242	72,5548	87,0658	87,0658	96,1351
54,4161	68,9271	65,2993	83,438	87,0658
41,719	41,719	50,7884	83,438	67,1132
74,3687	43,5329	50,7884	87,0658	65,2993
45,3468	105,204	96,1351	59,8577	88,8796
65,2993	87,0658	54,4161	61,6716	52,6022
59,8577	74,3687	56,23	63,4855	58,0438
47,1606	50,7884	56,23	87,0658	38,0913
50,7884	96,1351	36,2774	94,3213	92,5074
67,1132	90,6935	52,6022	77,9964	51,6242
56,23	52,6022	41,719	88,8796	85,2519
43,5329	58,0438	70,7409	58,0438	70,7409
39,9051	99,7629	48,9745	92,5074	59,8577
45,3468	54,4161	48,9745	85,2519	59,8577
43,5329	90,6935	54,4161	61,6719	58,0438
50,7884	43,5329	67,1132	94,3213	77,9964
62,6716	70,7409	92,5074	85,2519	83,438
43,5329	47,1606	68,9271	76,1826	79,8103
68,9271	65,2993	63,4855	70,7409	77,9964
41,719	68,9271	67,1132	65,2993	87,0658
54,4161	65,2993	45,3468	50,7884	74,3687
96,1351	67,1132	25,3942	50,7884	61,6716
41,719	65,2993	116,088	41,719	61,6716
48,9745	74,3687	92,5074	47,1606	94,3213
77,9964	77,9964	92,5074	92,5074	74,3687
61,6716	52,6022	96,1351	59,8577	85,2519
59,8577	87,0658	92,5074	90,6935	45,3468
63,4855	65,2993	48,9745	70,7406	76,1826
63,4855	43,5329	65,2993	56,23	96,1351
65,2993	54,4161	48,9745	56,23	70,7409
47,1606	48,9745	50,4884	88,8796	65,2993
45,3468	56,23	81,6242	65,2993	74,3687
45,3468	65,2993	101,577	90,6935	67,1132

45,3468	61,6716	52,6022	61,6716	87,0658
47,1606	63,4855	72,5548	54,4161	87,0658
36,2774	63,4855	54,4161	72,5548	59,5877
48,9745	50,7884	72,5548	72,5548	59,8577
59,8577	61,6716	94,3213	88,8796	54,4161
72,5548	87,0658	83,438	48,9745	48,9745
32,6497	52,6022	79,8103	96,1351	48,9745
43,5329	90,6935	70,7409	67,1132	65,2993
54,4161	61,6716	72,5548	87,0658	52,6022
47,1606	48,9745	65,2993	74,3687	50,7884
36,2774	54,4161	61,6716	79,8103	45,3468
38,0913	47,1606	52,6022	58,0438	50,7884
81,6242	41,719	79,8103	48,9745	47,1606
63,4855	65,2993	70,7409	59,8577	41,719
58,0438	67,1132	83,438	67,1132	61,6716
76,1826	54,4161	79,8103	59,8577	63,4855
90,6935	50,7884	65,2993	87,0658	67,1132
43,5329	61,6716	101,577	65,2993	59,8577
67,1132	63,4855	90,6935	63,4855	65,2993
59,8577	63,4855	74,3687	50,7884	58,0438
72,5548	67,1132	90,6935	81,6242	50,7884
70,7409	58,0438	87,0658	70,7409	70,7409
47,1606	68,9271	81,6242	65,2993	63,4855
43,5329	41,719	48,9745	52,6022	81,6242
47,1606	77,9964	48,9745	88,8796	92,5074
45,3468	54,4161	50,7884	65,2993	58,0438
48,9745	63,4855	70,7409	88,8796	59,8577
32,6497	36,2774	79,8103	72,5548	90,6935
70,7409	38,0913	65,2993	67,1132	79,8103
50,7884	61,6716	54,4161	67,1132	88,8796
50,7884	54,4161	36,2774	61,6716	88,8796
77,9964	81,6242	70,7409	48,9745	70,7409
87,0658	63,4855	54,4161	88,8796	56,23
52,6022	92,5074	68,9271	85,2519	67,1132
56,23	61,6716	77,9964	41,719	88,8796
52,6022	45,3468	83,438	41,719	68,9271
63,4855	58,0438	79,8103	59,8577	88,8796
56,23	68,9271	96,1351	58,0438	65,2993
58,0438	63,4855	77,9964	52,6022	61,6716
61,6716	76,1826	59,8577	63,4855	52,6022
67,1132	72,5548	88,8796	70,7409	72,5548
58,0438	107,018	107,018	67,1132	76,1826

MEDIDAS DAS ÁREAS DOS GRÂNULOS DAS AMOSTRAS U1RNP POSITIVAS (N=25)

<b>pg 13</b>	<b>pg 14</b>	<b>pg 15</b>	<b>soro 25</b>	<b>soro 28</b>	<b>soro 34</b>	<b>soro 35</b>
59,8577	50,7884	56,23	54,4161	63,4855	68,1135	55,2272
76,1826	85,2519	52,6022	59,8577	43,5329	58,909	64,4317
79,8103	74,3687	59,8577	58,0438	59,8577	66,2726	62,5908
103,991	79,8103	61,6716	36,2774	39,9051	60,7499	95,7271
119,715	79,8103	61,6716	79,8103	54,4161	64,4317	121,5
103,391	76,1826	45,3468	68,9271	45,3468	77,3181	66,2726
83,438	61,6716	76,1826	110,646	52,6022	101,25	73,6362
88,8796	85,2519	61,6716	83,438	50,7884	82,8408	64,4317
88,8796	79,8103	76,1826	67,1132	59,8577	103,091	58,909
54,4161	76,1826	47,1606	67,1132	47,1606	60,7499	90,2044
63,4855	50,7884	50,7884	87,0658	47,1606	79,159	73,6362
83,438	65,2993	63,4855	88,8796	36,2774	71,7953	69,9544
103,391	69,9271	48,9745	54,4161	45,3468	84,6817	58,909
72,5548	81,6242	79,8103	50,7884	63,4855	49,7045	77,3181
61,6716	65,2993	61,6716	54,4161	103,391	53,3863	64,4317
76,1826	70,7409	43,5329	90,6935	54,4161	79,159	75,4772
61,6716	77,9964	47,1606	117,902	67,1132	68,1135	46,0227
77,9964	72,5548	72,5548	52,6022	72,5548	60,7499	105,204
76,1826	58,0438	50,4884	52,6022	87,0658	68,1135	61,6716
88,8796	50,7884	58,0438	47,1606	59,8577	71,7953	64,4317
88,8796	76,1826	68,9271	54,4161	103,391	79,159	96,1351
77,9964	68,9271	94,3213	70,7409	99,7629	57,0681	34,4635
74,3687	61,6716	54,4161	65,2993	79,8103	42,3408	58,909
87,0658	67,1132	61,6716	79,8103	61,6716	58,909	58,0438
70,7409	59,8577	59,8577	67,1132	54,4161	57,0681	85,2519
67,1132	52,6022	85,2519	68,9271	90,6935	57,0681	63,4855
72,5548	67,1132	87,0658	41,719	90,6935	79,159	67,1132
59,8577	72,5548	67,1132	68,9271	87,0658	99,4089	63,4855
77,9964	72,5548	65,2993	56,23	76,1826	47,8636	112,46
79,8104	72,5548	61,6716	65,2993	67,1132	42,3408	83,438
83,438	76,1826	50,7884	74,3687	47,1606	69,9544	72,5548
87,0658	76,1826	32,6497	68,9271	43,5329	55,2272	41,719
83,438	77,9964	52,6022	81,6242	56,23	69,9544	92,5074
83,438	74,3687	54,4161	52,6022	65,2993	103,091	83,438
65,2993	67,1132	59,8577	77,9964	85,2519	84,6817	74,3687
81,6242	59,8577	59,8577	79,8103	48,9745	80,9999	110,646
59,8577	56,23	63,4855	52,6022	61,6716	79,159	103,391
77,9964	65,2993	88,8796	81,6242	45,3468	90,2044	123,343
72,5548	58,0438	59,8577	70,7409	39,9051	88,3635	101,577
70,7409	96,1351	48,9745	67,1132	67,1132	47,8639	116,088
52,6022	83,438	48,9745	67,1132	41,719	104,932	103,391
59,8577	67,1132	56,23	90,6935	39,9051	95,7271	96,1351
67,1132	54,4161	74,3687	92,5074	61,6716	101,25	96,1351
79,8103	63,4855	76,1826	68,9271	52,6022	65,5908	92,5074
68,9271	50,7884	58,0438	50,7884	47,1606	68,1135	74,3687
67,1132	67,1132	43,5329	61,6716	43,5329	77,3181	81,6242
72,5548	59,8577	45,3468	94,3213	45,3468	95,7271	74,3687

59,8577	72,5548	52,6022	59,8577	50,7884	66,2726	67,1132
54,4161	63,4855	45,3468	61,672	45,3468	66,2726	88,8786
68,9271	38,0913	43,5329	54,4161	41,719	62,5908	88,8796
74,3687	59,8577	50,7884	56,23	58,0438	55,2272	58,0496
50,7884	54,4161	34,4635	70,7409	47,1606	84,6817	83,438
79,8103	59,8577	47,1606	68,9271	38,0913	71,7953	94,3212
63,4855	50,7884	48,9745	61,6716	58,0438	53,3863	48,9745
70,7409	67,1132	61,6716	68,9271	52,6022	60,7499	63,4855
61,6716	58,0438	58,0438	63,4855	56,23	60,7499	107,018
87,0658	52,6022	58,0438	83,438	41,719	75,4772	81,6242
79,8103	76,1826	58,0438	58,0438	50,7884	49,7045	67,1132
83,438	47,1606	76,1826	61,6716	48,9745	51,5454	58,8577
83,438	58,0438	79,8103	52,6022	83,438	57,0681	56,23
67,1132	65,2993	58,0438	59,8577	59,8577	49,7045	45,3468
77,9964	68,9271	56,23	47,1606	41,719	51,5454	48,9745
77,9964	65,2993	48,9745	47,1606	48,9745	75,4772	47,1606
79,8103	63,4855	43,5329	41,719	36,2774	71,7953	72,5548
74,3687	83,438	59,8577	63,4855	43,5329	53,3863	48,9745
58,0438	59,8577	38,0913	68,9271	61,6716	62,5908	56,23
87,0658	56,23	50,7884	63,4855	54,4161	66,2726	58,0438
74,3687	59,8577	59,8577	72,5548	54,4161	79,159	68,9271
65,2993	65,2993	63,4855	43,5329	52,6022	80,9999	68,9271
79,8103	65,2993	67,1132	52,6022	68,9271	60,7499	50,7884
90,6395	43,5329	50,7884	67,1132	41,719	68,1135	68,9271
76,1826	59,8577	79,8103	61,6716	47,1606	92,0453	48,9745
77,9964	68,9271	56,23	74,3687	59,8577	51,5454	56,23
77,9964	50,7884	56,23	38,0913	52,6022	82,8408	94,3213
54,4161	65,2993	61,6716	61,6716	56,23	75,4772	83,438
63,4855	58,0438	45,3468	48,9745	47,1606	86,5226	67,1132
79,8103	74,3687	43,5329	50,7884	48,9745	93,8862	52,6022
77,9964	83,438	50,7884	45,3468	43,5329	62,5908	58,0438
61,6716	70,7409	59,8577	87,0658	50,7884	69,9544	86,5226
76,1826	52,6022	47,1606	65,2993	56,23	57,0681	68,9271
97,949	50,7884	52,6022	56,23	54,4161	53,3863	107,018
96,1351	58,8577	65,2993	48,9745	68,9271	36,8181	79,8103
87,0658	56,23	61,6716	52,6022	54,4161	46,0227	67,1132
79,8103	68,9271	52,6022	87,0658	67,1132	66,2726	103,391
52,6022	85,2519	56,23	61,6716	96,1351	60,7499	59,8577
81,6242	59,8577	59,8577	56,23	65,2993	53,3863	32,6497
52,6022	39,9051	58,0438	52,6022	72,5548	51,5454	48,9745
65,293	58,0438	52,6022	67,1132	54,4161	86,5226	68,9271
87,0658	68,9271	65,2993	48,9745	47,1606	86,5226	67,1132
68,9271	70,7409	48,9745	68,9271	56,23	53,3863	59,8577

<b>soro 36</b>	<b>soro 37</b>	<b>soro 41</b>	<b>soro 44</b>	<b>soro 45</b>	<b>soro 47</b>	<b>soro 48</b>
67,1132	61,6716	54,4161	56,23	145,11	52,6022	155,993
59,8577	54,4161	52,6022	81,6242	101,577	68,9271	74,3687
48,9745	47,1606	67,1132	85,2519	54,4161	77,9964	116,088
56,23	70,7409	61,6716	81,6242	117,902	47,1606	99,7629
76,1826	27,2081	54,4161	56,23	107,018	68,9271	61,6716
39,9051	70,7409	47,1606	65,2993	117,902	50,7884	90,6935
36,2774	48,9745	61,6716	54,4161	92,5074	65,2993	88,8796
58,0438	48,9745	67,1132	48,9745	61,6716	67,1132	68,9271
76,1826	67,1132	63,4855	96,1351	90,6935	63,4855	50,7884
52,6022	68,9271	67,1132	48,9745	92,5074	79,8103	90,6935
56,23	47,1606	87,0658	63,4855	76,1826	61,6716	79,8103
72,5548	43,5329	52,6022	63,4855	67,1132	70,7409	96,1351
48,9745	107,018	52,6022	59,8577	41,719	59,8577	58,0438
56,23	47,1606	58,0438	27,2081	61,6716	52,6022	77,9964
45,3468	58,0438	52,6022	38,0913	58,0438	50,7884	50,7884
54,4161	38,0913	58,0438	63,4855	77,9964	45,3468	85,2519
61,6716	34,4635	74,3687	52,6022	58,0438	48,9745	83,438
43,5329	48,9745	90,6935	59,8577	52,6022	45,3468	68,9271
59,8577	70,7409	87,0658	29,0219	39,9051	65,2993	94,3213
58,0438	47,1606	50,7884	43,5329	56,23	52,6022	76,1826
70,7409	45,3468	56,23	50,7884	87,0658	58,0438	67,1132
45,3468	87,0658	61,6716	52,6022	56,23	47,1606	65,2993
43,5329	29,0219	58,0438	41,719	47,1606	67,1132	41,719
70,7409	59,8577	70,7409	59,8577	67,1132	41,719	61,6716
43,5329	61,6716	63,4855	36,2774	65,2993	48,9745	54,4161
47,1606	67,1132	52,6022	65,2993	59,8577	36,2774	39,9051
67,1132	59,8577	94,3213	38,0913	99,7629	54,4161	48,9745
41,719	48,9745	72,5548	58,0438	63,4855	61,6716	63,4855
34,4635	54,4161	41,719	50,7884	54,4161	54,4161	47,1606
54,4161	38,0913	97,949	47,1606	87,0658	41,719	72,5548
47,1606	63,4855	52,6022	81,6242	77,9964	68,9271	63,4855
52,6022	72,5548	87,0658	45,3468	92,5074	52,6022	61,6716
59,8577	67,1132	77,9964	74,3687	76,1826	72,5548	50,7884
52,6022	85,2519	67,1132	54,4161	59,8577	63,4855	61,6716
72,5548	105,204	85,2519	45,3468	52,6022	85,2519	65,2993
43,5329	97,949	59,8577	36,2774	79,8103	76,1826	48,9745
54,4161	61,6716	63,4855	65,2993	43,5329	45,3468	81,6242
63,4855	107,018	52,6022	79,8103	56,23	34,4635	107,018
63,4855	83,438	87,0658	65,2993	50,7884	68,9271	79,8103
63,4855	107,018	52,6022	74,3687	70,7409	47,1606	96,1651
45,3468	74,3687	68,9271	54,4161	54,4161	39,9051	67,1132
50,7884	67,1132	43,5329	61,6716	61,6716	48,9745	85,2519
77,9964	56,23	34,4635	43,5329	83,438	56,23	54,4161
74,3687	63,4855	50,7884	70,7409	76,1826	36,2774	101,577
43,5329	70,7409	41,719	36,2774	70,7409	45,3468	77,9964
63,4855	112,46	68,9271	76,1826	63,4855	43,5329	67,1132
39,9051	81,6242	76,1826	39,9051	65,2993	63,4855	63,1132
52,6022	54,4161	81,6242	47,1606	45,3468	61,6718	83,438
68,9271	74,3687	96,1351	58,8577	68,9271	68,9271	126,971



56,23	56,23	87,0658	41,719	54,4161	63,4855	54,4161
65,2993	76,1826	63,4855	59,8577	61,6716	50,7884	61,6716
43,5329	70,7409	97,949	72,5548	63,4855	54,4161	47,1606
45,3468	58,0438	88,8796	61,6716	92,5074	39,9051	61,6716
27,2081	63,4855	119,715	65,2993	87,0658	38,0913	107,018
54,4161	38,0913	61,6716	48,9745	83,438	52,6022	63,4855
61,6716	65,2993	56,23	41,719	54,4161	79,8103	47,1606
54,4161	50,7884	65,2993	30,8358	56,23	79,8103	83,438
74,3687	81,6242	79,8103	32,6497	85,2519	54,4161	81,6242
68,9271	96,1351	39,9051	50,7884	45,3468	39,9051	63,4855
39,9051	83,438	45,3468	50,7884	70,7409	59,8577	56,23
65,2993	67,1132	52,6022	45,3468	76,1826	50,7884	103,391
68,9271	61,6716	58,0438	50,7884	61,6716	58,0438	87,0658
56,23	63,4855	52,6022	61,6716	92,5074	43,5329	70,7409
52,9022	94,3213	52,6022	61,6716	65,2993	61,6716	56,23
47,1606	50,7884	58,0438	41,719	65,2993	43,5329	58,0438
47,1606	68,9271	56,23	68,9271	68,9271	56,23	61,6716
47,1606	83,438	58,0438	70,7409	107,018	76,1826	59,8577
45,3468	67,1132	70,7409	52,6022	77,9964	56,23	74,3687
27,2081	39,9051	54,4161	34,4635	85,2519	47,1606	56,23
72,5548	54,4161	54,4161	47,1606	50,7884	79,8103	32,6497
63,4855	47,1606	36,2774	54,4161	88,8796	94,3213	77,9964
76,1826	61,6716	65,2993	32,6497	85,2517	43,5329	72,5548
85,2519	54,4161	56,23	48,9745	63,4855	81,6242	59,8577
45,3468	48,9745	70,7409	50,7884	68,9271	59,8577	56,23
47,1606	38,0913	47,1606	59,8577	41,719	61,6716	67,1132
76,1826	54,4161	67,1132	48,9745	70,7409	61,6716	70,7409
83,438	38,0913	43,5329	88,8796	67,1132	68,9271	76,1826
79,8103	58,0438	61,6716	77,9964	59,8577	77,9964	76,1826
59,8577	39,9051	67,1132	39,9051	72,5548	67,1132	45,3468
83,438	58,0438	61,6716	67,1132	105,204	67,1132	70,7409
48,9745	59,8577	56,23	70,7409	67,1132	50,7884	56,23
39,9051	47,1606	50,7884	36,2774	39,9051	90,6935	72,5548
58,0438	59,8577	48,9745	61,6716	54,4161	61,6716	81,6242
68,9271	67,1132	50,7884	50,7884	58,0438	85,2519	81,6242
85,2519	50,7884	63,4855	29,0219	79,8103	59,8577	70,7409
68,9271	43,5329	39,9051	58,0438	50,7884	68,9271	47,1606
97,949	85,2519	79,8103	68,9271	67,1132	88,8796	68,9271
76,1826	59,8577	50,7884	63,4855	83,438	68,9271	85,2519
58,0438	50,7884	56,23	43,5329	76,1826	61,6716	68,9271
68,9271	63,4855	67,1132	65,2993	43,5329	59,8577	79,8103

<b>soro 52</b>	<b>soro 54</b>	<b>soro 55</b>	<b>soro 56</b>	<b>soro 57</b>	<b>soro 58</b>	<b>soro 59</b>
58,0438	85,2519	61,6716	58,0438	50,7884	125,157	88,8796
72,5548	81,6242	76,1826	65,2993	48,9745	88,8796	61,6716
58,0438	58,0438	67,1132	76,1826	52,6022	70,7409	56,23
96,1351	90,6935	54,4161	59,8577	74,3687	87,0658	92,5074
61,6716	88,8796	76,1826	68,9271	65,2993	48,9745	107,018
52,6022	70,7409	76,1826	65,2993	72,5548	67,1132	92,5074
77,9964	83,438	54,4161	72,5548	68,9271	58,0438	72,5548
83,438	61,6716	72,5548	77,9964	56,23	77,9964	67,1132
54,4161	67,1132	77,9964	87,0658	59,8577	68,9271	45,3468
87,0658	90,6935	56,23	67,1132	54,4161	81,6242	85,2519
54,4161	85,2519	58,0438	72,5548	63,4855	48,9745	63,4855
59,8577	63,4855	61,6716	81,6242	65,2993	125,157	58,0438
101,577	56,23	63,4855	79,8103	39,9051	48,9745	70,7409
85,2519	47,1606	72,5548	67,1132	41,4719	72,5548	50,7884
76,1826	74,3687	48,9745	92,5074	43,5329	97,949	77,9964
83,438	70,7409	56,23	67,1132	74,3687	48,9745	105,204
85,2519	77,9964	59,8577	67,1132	59,8577	50,7884	94,3213
58,0438	81,6242	72,5548	76,1826	70,7409	70,7409	110,646
58,0438	87,0658	67,1132	76,1826	63,4855	59,8577	43,5329
54,4161	70,7409	76,1826	68,9271	70,7409	43,5329	90,6935
50,7884	72,5549	56,23	59,8577	63,4855	76,1826	63,4855
63,4855	61,6716	76,1826	70,7409	54,4161	67,1132	43,5329
38,0913	77,9964	61,6716	72,5548	52,6022	56,23	52,6022
30,8358	58,0438	79,8103	68,9271	61,6716	58,0438	48,9745
77,9964	76,1826	77,9964	52,6022	63,4855	58,0438	76,1826
61,6716	74,3687	85,2519	74,3687	45,3468	77,9964	43,5329
61,6716	90,6935	79,8103	72,5548	54,4161	47,1606	83,438
59,8577	81,6242	67,1132	74,3687	70,7409	85,2519	65,2993
83,438	99,7629	68,9271	67,1132	58,0438	48,9745	58,0438
68,9271	90,6935	72,5548	59,8577	59,8577	65,2993	77,9964
45,3468	99,7629	68,9271	59,8577	63,4855	85,2519	65,2993
50,7884	76,1824	50,7884	77,9964	72,5548	52,6022	45,3468
52,6022	70,7409	83,438	72,5548	65,2993	56,23	81,6242
67,1132	77,9964	77,9964	63,4855	74,3687	50,7884	29,0219
65,2993	87,0658	70,7409	61,6716	68,9271	72,5548	43,5329
61,6716	85,2519	92,5074	61,6716	81,6242	58,0438	52,6022
63,4855	79,8103	61,6716	65,2993	70,7409	56,23	88,8796
56,23	85,2519	70,7409	96,1351	63,4855	72,5548	85,2519
54,4161	72,5548	74,3687	72,5548	58,0438	68,9271	72,5548
77,9964	79,8103	79,8103	67,1132	67,1132	52,6022	41,719
50,7884	61,6716	68,9271	63,4855	61,6716	68,9271	59,8577
74,3687	70,7409	68,9271	63,4855	56,23	43,5329	65,2993
38,0913	90,6935	63,4855	52,6022	68,9271	34,4635	76,1826
67,1132	96,1351	74,3687	59,8577	65,2993	47,1606	61,6716
56,23	83,438	79,8103	63,4855	59,8577	38,0913	59,8577
58,8577	61,6716	47,1606	74,3687	87,0658	65,2993	90,6935
87,0658	67,1132	67,1132	67,1132	72,5548	47,1606	54,4161
54,4161	76,1826	58,0438	67,1132	88,8796	74,3687	126,971
59,8577	77,9964	63,4855	63,4855	81,6242	56,23	68,9271

65,2993	77,9964	63,4855	63,4855	70,7409	48,9745	54,4161
85,2519	76,1826	65,2993	54,4161	70,7409	48,9745	67,1132
54,4161	88,8796	88,8796	59,8577	72,5548	83,438	65,2993
38,0913	67,1132	63,4855	70,7409	68,9271	59,8577	79,8103
68,9271	81,6242	76,1826	79,8103	65,2993	85,2519	58,0438
45,3468	85,2519	58,0438	59,8577	48,9745	63,4855	65,2993
56,23	85,2519	56,23	58,0438	59,8577	61,6716	54,4161
97,949	77,9964	61,6716	61,6716	59,0438	65,2993	58,0438
94,3213	97,949	76,1826	56,23	50,7884	68,9271	68,9271
65,2993	92,5074	68,9271	56,23	54,4161	56,23	41,719
48,9745	74,3687	83,438	56,23	52,6022	107,018	59,8577
72,5548	79,8103	63,4855	97,949	63,4855	76,1826	87,0658
88,8796	92,5074	65,2993	105,24	56,23	54,4161	45,3468
76,1826	87,0658	67,1132	81,6242	72,5548	52,6022	61,6716
65,2993	83,438	56,23	88,8796	79,8103	59,8577	50,7884
72,5548	96,1351	76,1826	90,9635	65,2993	67,1132	61,6716
48,9745	88,8796	59,8577	90,6935	77,9964	79,8103	48,9745
52,6022	87,0658	65,2993	65,2993	54,4161	105,204	81,6242
63,4855	79,8103	76,1826	90,6935	65,2993	50,7884	50,7884
56,23	67,1132	67,1132	83,438	43,5329	90,6935	58,0438
61,6716	88,8796	59,8577	85,2519	72,5548	36,2774	61,6716
58,0438	92,5074	70,7409	81,6242	59,8577	54,4161	79,8103
61,6716	79,8103	61,6716	87,0658	61,6716	56,23	77,9964
45,3468	103,391	68,9271	67,1132	45,3468	79,8103	97,949
61,6716	105,204	48,9745	77,9964	41,719	48,9745	48,9745
77,9964	123,343	58,0438	58,0438	52,6022	67,1132	85,2519
54,4161	85,2519	59,8577	56,23	61,6716	63,4855	54,4161
39,9051	107,018	56,23	77,9964	56,23	65,2993	90,6935
50,7884	110,646	54,4161	74,3687	63,4855	74,3687	85,2519
61,6716	76,1826	63,4855	61,6716	65,2993	58,0438	72,5548
50,7884	79,8103	47,1606	68,9271	76,1826	67,1132	76,1826
43,5329	88,8796	63,4855	68,9271	68,9271	77,9964	83,438
77,9964	72,5548	54,4161	56,23	54,4161	56,23	61,6716
58,0438	77,9964	48,9745	56,23	56,23	54,4161	58,0438
50,7884	68,9271	58,0438	58,0438	65,2993	50,7884	61,6716
45,3468	67,1132	50,7884	77,9964	56,23	65,2993	38,0913
59,8577	67,1132	70,7409	81,6242	63,4855	83,438	81,6242
56,23	96,1351	65,2993	74,3687	52,6022	67,1132	65,2993
67,1132	72,5548	59,8577	59,8577	59,8577	77,9964	58,0438
70,7409	68,9271	67,1132	76,1826	67,1132	47,1606	43,5329
103,391	85,2519	63,4855	76,1826	63,4855	59,8577	85,2519

<b>soro 61</b>	<b>soro 63</b>	<b>soro 68</b>	<b>soro 70</b>
90,6935	47,1606	50,7884	70,7409
59,8577	54,4161	81,6242	61,6719
50,7884	61,6716	41,719	77,9964
85,2519	74,3687	77,9964	65,2993
38,0913	54,4161	65,2993	56,23
90,6935	50,7884	56,23	77,9964
74,3687	65,2993	81,6242	83,438
67,1132	70,7409	48,9745	76,1826
83,438	90,6935	63,4855	63,4855
76,1826	81,6242	76,1826	47,1606
96,1351	63,4855	63,4855	87,0658
70,7409	83,438	68,9271	56,23
63,4855	59,8577	68,9271	96,1351
56,23	65,2993	77,9964	61,6716
65,2993	65,2993	76,1826	47,1606
77,9964	48,9745	50,7884	41,719
65,2993	63,4855	65,2993	38,0913
81,6242	43,5329	54,4161	85,2519
54,4161	39,9051	39,9051	94,3213
52,6022	61,6716	81,6242	96,1351
79,8103	52,6022	38,0913	105,204
85,2519	43,5329	61,6716	81,6242
56,23	67,1132	54,4161	76,1826
54,4161	47,1606	77,9964	59,8577
87,0658	76,1826	54,4161	50,7884
92,5074	63,4855	48,9745	47,1606
52,6022	41,719	85,2519	74,3687
58,0438	59,8577	54,4161	81,6242
81,6242	29,0219	63,4855	92,5074
45,3468	52,6022	63,4855	54,4161
68,9271	56,23	47,1606	65,2993
54,4161	61,6716	59,8577	58,0438
61,6716	56,23	39,9051	56,23
88,8796	43,5329	74,3687	67,1132
50,7884	70,7409	79,8103	79,8103
48,9745	45,3468	83,438	68,9271
54,4161	45,3468	77,9964	52,6022
43,5329	43,5329	61,6716	54,4161
77,9964	58,0438	74,3687	47,1606
70,7409	52,6022	58,0438	63,4855
48,9745	43,5329	48,9745	61,6716
58,0438	61,6716	50,7884	68,9271
74,3687	52,6022	50,7884	54,4161
45,3468	68,9271	50,7884	61,6716
59,8577	79,8103	81,6242	87,0658
58,0438	87,0658	85,2519	76,1826
50,7884	58,0438	70,7409	77,9964
70,7409	81,6242	108,832	52,6022
52,6022	61,6716	94,3213	90,6935

79,8103	36,2774	45,3468	70,7409
48,9745	41,719	27,2081	77,9964
70,7409	88,8796	70,7409	59,8577
58,0438	103,391	83,438	68,9271
77,9964	77,9964	67,1132	39,9051
52,6022	68,9271	77,9964	56,23
83,438	65,2993	68,9271	97,949
54,4161	79,8103	65,2993	76,1826
56,23	72,5548	48,9745	70,7409
43,5329	88,8796	79,8103	43,5329
59,8577	47,1606	79,8103	79,8103
68,927	92,5074	76,1826	67,1132
59,8577	47,1606	103,391	67,1132
47,1606	58,0438	77,9964	74,3687
47,1606	47,1606	38,0913	43,5329
58,0438	67,1132	52,6022	41,719
88,8796	68,9271	77,9964	81,6242
83,438	65,2993	65,2993	88,8796
43,5329	45,3468	50,7884	43,5329
77,9964	45,3468	68,9271	58,0438
74,3687	39,9051	67,1132	81,6242
52,6022	34,4635	76,1826	58,0438
59,8577	76,1826	79,8103	72,5548
81,6242	65,2993	90,6935	43,5329
67,1132	72,5548	96,1351	58,0438
48,9745	58,0438	72,5548	76,1826
72,5548	47,1606	76,1826	72,5548
63,4855	74,3687	92,5074	52,6022
43,5329	61,6716	123,343	58,0438
85,2519	41,719	121,529	43,5329
61,6716	68,9271	74,3687	41,719
43,5329	81,6242	81,6242	54,4161
76,1826	38,0913	99,7629	63,4855
70,7409	47,1606	119,715	45,3468
32,6497	39,9051	77,9964	74,3687
67,1132	52,6022	36,2774	70,7409
67,1132	59,8577	67,1132	63,4855
61,6716	70,7409	43,5329	58,0438
61,6716	48,9745	39,9051	72,5548
74,3687	72,5548	77,9964	59,8577
59,8577	52,6022	47,1606	76,1826

**Medidas das áreas dos grânulos das amostras controles (n=17)**

<b>soro 15</b>	<b>soro 16</b>	<b>soro 22</b>	<b>soro 23</b>	<b>soro 29</b>	<b>soro 32</b>
56,23	74,3687	112,46	70,7409	81,6242	65,2993
61,6716	61,6716	67,1132	61,6716	143,296	41,719
65,2993	90,6935	96,1351	54,4161	117,902	39,9051
68,9271	136,04	105,204	67,1132	99,7629	50,7884
63,4855	146,923	68,9271	63,4855	74,3687	47,1606
50,7884	52,6022	68,9271	36,2774	74,3687	43,5329
39,0913	110,646	92,5074	56,23	137,854	56,23
72,5548	77,9946	72,5546	52,6022	119,715	52,6022
81,6242	83,438	70,7409	54,4161	117,902	39,9051
79,8103	116,688	87,0658	45,3468	61,6716	79,8103
99,7629	94,3213	81,6242	50,7884	94,3213	41,719
63,4855	108,832	94,3213	67,1132	76,1826	90,6935
67,1132	103,391	107,018	47,1606	92,5074	58,0438
77,9964	139,668	67,1132	52,6022	112,46	43,5329
70,7409	177,759	99,7629	47,1606	119,715	56,23
39,9051	128,785	105,204	47,1606	65,2993	52,6022
97,949	48,9745	79,8103	52,6022	105,204	48,9745
52,6022	101,577	130,599	47,1606	94,3213	68,9271
77,9942	130,599	87,0658	72,5548	105,204	90,6935
70,7409	90,6935	79,8103	90,6935	103,391	88,8796
79,8103	48,9745	54,4161	68,9271	76,1826	77,9964
59,8577	67,1132	88,8796	56,23	90,6935	68,9271
85,2519	72,5548	70,7409	61,6716	76,1826	68,9271
61,6716	72,5548	68,9271	61,6716	90,6935	99,7629
70,7409	105,204	117,902	39,9051	97,949	65,2993
50,7884	107,018	90,6935	74,3687	83,438	52,6022
77,9964	70,7409	76,1826	68,9271	56,23	52,6022
76,1826	101,577	83,438	65,2993	63,4855	59,8577
47,1606	52,6022	68,9271	74,3687	59,8577	38,0913
56,23	67,1132	74,3687	59,8577	72,5548	68,9271
67,1132	116,088	65,2993	65,2993	90,6935	52,6022
74,3687	165,062	68,9271	59,8577	90,6935	72,5548
70,7409	70,7409	52,6022	59,8577	65,2993	58,0438
68,9271	27,2081	92,5074	39,9051	67,1132	65,2993
61,6716	56,23	99,7629	65,2993	58,0438	38,0913
72,5548	81,6242	59,8577	58,0438	58,0438	54,4161
43,5329	77,9964	54,4161	77,9964	61,6716	63,4855
85,2519	65,2993	76,1826	54,4161	67,1132	92,5074
76,1826	83,438	76,1826	67,1132	161,434	47,1606
101,577	72,5548	56,23	59,8577	117,902	150,551
76,1826	99,7629	125,157	50,7884	128,785	74,3687
83,438	96,1351	77,9964	48,9745	61,6716	59,8577
47,1606	81,6242	92,5074	36,2774	90,6935	68,9271
74,3687	97,949	67,1132	63,4855	61,6716	59,8577
67,1132	87,0658	61,6716	47,1606	105,204	97,949
50,7884	157,807	139,668	54,4161	96,1351	83,438
92,5074	90,6935	119,715	59,8577	116,088	96,1351
97,949	125,157	126,971	54,4161	96,1351	74,3687

45,3468	70,7409	65,2993	47,1606	74,3687	85,2519
68,9271	61,6716	121,529	48,9745	79,8103	74,3687
65,2993	148,737	79,8103	41,719	76,1826	87,0658
47,1606	150,551	94,3213	68,9271	125,157	74,3687
54,4161	96,1351	92,5074	59,8577	112,46	90,6935
74,3687	67,1132	63,4855	68,9271	107,018	43,5329
38,0913	70,7409	87,0658	50,7884	112,46	96,1351
79,8103	108,832	92,5074	70,7409	103,391	65,2993
47,1606	79,8103	90,6935	65,2993	67,1132	61,6716
50,7884	56,23	107,018	48,9745	65,2993	90,6935
48,9745	65,2993	136,04	67,1132	90,6935	50,7884
52,6022	83,438	103,391	63,4855	107,018	96,1351
83,438	65,2993	85,2519	59,8577	97,949	50,7884
65,2993	85,438	130,599	54,4161	77,9964	52,6022
74,3687	41,719	54,4161	52,6022	81,6242	56,23
72,5548	59,8577	63,4855	58,0438	117,902	45,3468
59,8577	101,577	65,2993	41,719	76,1826	52,6022
68,9271	119,715	96,1351	43,5329	96,1351	52,6022
58,0438	92,507	76,1826	50,7884	90,6935	67,1132
70,7409	134,226	88,8796	41,719	36,2774	61,6716
70,7409	79,8103	103,391	52,6022	117,902	107,018
79,8103	68,9271	67,1132	34,4635	81,6242	70,7409
52,6022	68,9271	87,0658	41,719	87,0658	70,7409
76,1826	76,1826	79,8103	59,8577	65,2993	38,0913
54,4161	92,5074	90,6935	56,23	65,2993	50,7884
99,7629	114,274	83,438	38,0913	72,5548	52,6022
96,1351	126,971	72,5548	59,8577	107,018	41,719
67,1132	61,6716	79,8103	50,7884	92,5074	47,1606
63,4855	96,1351	68,9271	39,9051	92,5074	94,3213
68,9271	88,8796	68,9271	61,6716	94,3213	87,0658
68,9271	108,832	65,2993	59,8577	83,438	38,0913
59,8577	123,343	58,0438	54,4161	56,23	58,0438
67,1132	83,438	70,7409	36,2774	67,1132	56,23
87,0658	72,5548	70,7409	76,1826	90,6935	54,4161
61,6716	96,1351	67,1132	54,4161	110,646	128,785
96,1351	67,1132	90,6935	43,5329	68,9271	79,8103
94,3213	87,0658	72,5548	56,23	108,832	90,6935
99,7629	77,9964	76,1826	58,0438	125,157	58,0438
76,1826	70,7409	68,9271	54,4161	70,7409	56,23
61,6716	70,7409	83,438	76,1826	70,7409	99,7629
54,4161	99,7629	87,0658	54,4161	76,1826	76,1826
68,9271	88,8796	94,3213	70,7409	67,1132	70,7409

<b>soro 51</b>	<b>soro 64</b>	<b>soro 65</b>	<b>soro 74</b>	<b>soro 151</b>	<b>soro 152</b>
59,8577	67,1132	58,0438	63,4855	76,1826	65,2993
50,7884	58,0438	90,6935	72,5548	58,0438	47,1606
43,5329	68,9271	83,438	61,6716	52,6022	81,6242
43,5329	61,6716	99,7629	65,2993	65,2993	61,6716
59,8577	70,7409	99,7629	88,8796	72,5548	47,1606
59,8577	59,8577	81,6242	67,1132	61,6716	68,9271
50,7884	90,6935	74,3687	99,7629	63,4855	92,5074
56,23	47,1606	63,4855	103,391	61,6716	39,9051
50,7884	56,23	72,5548	103,391	58,0438	76,1826
43,5329	85,2519	50,7884	94,3213	76,1826	94,3213
43,5329	103,391	52,6022	79,8103	39,9051	81,6242
85,2519	94,3213	68,9271	76,1826	68,9271	67,1132
39,9051	87,0658	65,2993	54,4161	76,1826	74,3687
72,5548	77,9964	72,5548	68,9271	59,8577	63,4855
52,6022	76,1826	103,391	117,902	47,1606	47,1606
47,1606	61,6716	77,9964	90,6935	48,9745	70,7409
54,4161	67,1132	67,1132	48,9745	48,9745	94,3213
83,438	65,2993	83,438	88,8796	59,8577	74,3687
38,0913	38,0913	77,9964	77,9964	39,9051	90,6935
48,9745	94,3213	67,1132	70,7409	54,4161	103,391
41,719	59,8577	47,1606	47,1606	48,9745	81,6242
70,7409	48,9745	119,715	76,1826	96,1351	81,6242
47,1606	56,23	77,9964	59,8577	83,438	79,8103
59,8577	65,2993	101,577	59,8577	90,6835	94,3213
59,8577	83,438	114,274	70,7409	36,2774	81,6242
56,23	67,1132	87,0658	83,438	54,4161	45,3468
54,4161	90,6935	70,7409	59,8577	36,2774	70,7409
68,9271	39,9051	67,1132	58,0438	34,4635	74,3687
34,4635	72,5548	96,1351	61,6716	76,1826	67,1132
38,0913	43,5329	58,0438	68,9271	54,4161	81,6242
38,0913	39,9051	54,4161	63,4855	43,5329	105,204
65,2993	59,8577	41,719	90,6935	67,1132	88,8796
54,4161	36,2774	63,4855	52,6022	61,6716	61,6716
70,7409	54,4161	81,6242	58,0438	63,4855	56,23
79,8103	76,1826	77,9964	61,6716	85,2519	76,1826
56,23	52,6022	85,2519	77,9964	52,6022	58,0438
68,9271	59,8577	70,7409	54,4161	59,8577	45,3468
63,4855	83,438	54,4161	88,8796	67,1132	94,3213
54,4161	81,6242	68,9271	67,1132	61,6716	68,9271
72,5548	54,4161	58,0438	74,3687	74,3687	58,0438
63,4855	54,4161	56,23	70,7409	59,8577	74,3687
72,5548	72,5548	76,1826	54,4161	63,4855	67,1132
65,2993	70,7409	81,6242	101,577	48,9745	58,0438
65,2993	96,1351	83,438	48,9745	52,6022	79,8103
105,204	65,2993	94,3213	90,6935	76,1826	110,646
65,2993	48,9745	79,8103	47,1606	72,5548	54,4161
58,0438	94,3213	79,8103	54,4161	74,3687	58,0438
58,0438	52,6022	107,018	85,2519	101,577	50,7884
45,3468	105,204	50,7884	70,7409	52,6022	63,4855



76,1826	56,23	70,7409	67,1132	74,3687	83,438
58,0438	59,8577	58,0438	48,9745	70,7409	88,8796
79,8103	74,3687	54,4161	50,7884	85,2519	77,9964
68,9271	96,1351	43,5329	96,1351	88,8796	101,577
36,2774	87,0658	50,7884	61,6716	54,4161	88,8796
94,3213	83,438	63,4855	74,3687	58,0438	72,5548
61,6716	61,6716	61,6716	67,1132	56,23	63,4855
72,5548	112,46	70,7409	61,6716	92,5074	74,3687
67,1132	74,3687	70,7409	107,018	48,9745	90,6935
65,2993	39,9051	88,8796	74,3687	67,1132	79,8103
50,7884	76,1826	94,3213	103,391	45,3468	88,8796
112,46	81,6242	77,9964	65,2993	59,8577	67,1132
99,7629	54,4161	59,8577	70,7409	87,0658	70,7409
103,391	50,7884	83,438	96,1351	74,3687	90,6935
45,3468	108,832	59,8577	88,8796	79,8103	107,018
63,4855	68,9271	76,1826	50,7884	105,204	56,23
74,3687	65,2993	65,2993	67,1132	94,3213	79,8103
87,0658	68,9271	88,8796	90,6935	54,4161	70,7409
92,5074	52,6022	72,5548	92,5074	74,3687	54,4161
52,6022	50,7884	54,4161	65,2993	43,5329	72,5548
108,832	63,4855	70,7409	58,0438	74,3687	77,9964
47,1606	90,6935	54,4161	87,0658	79,8103	65,2993
59,8577	54,4161	52,6022	59,8577	88,8796	87,0658
41,719	77,9964	87,0658	83,438	38,0913	56,23
90,6935	61,6716	77,9964	88,8796	45,3468	67,1132
58,0438	39,9051	68,9271	72,5548	50,7884	94,3213
94,3213	83,438	88,8796	76,1826	48,9745	77,9964
99,7629	59,8577	76,1826	47,1606	38,0913	88,8796
96,1351	58,0438	94,3213	41,719	72,5548	92,5074
90,6935	70,7409	81,6242	90,6935	72,5548	72,5548
116,088	92,5074	99,7629	54,4161	81,6242	79,8103
76,1826	101,577	119,715	58,0438	67,1132	72,5548
103,391	70,7409	87,0658	70,7409	58,0438	50,7884
67,1132	83,438	85,2519	108,832	77,9964	90,6935
63,4855	70,7409	72,5548	79,8103	65,2993	65,2993
59,8577	76,1826	52,6022	103,391	70,7409	79,8103
72,5548	72,5548	76,1826	72,5548	56,23	77,9964
72,5548	38,0913	77,9964	63,4855	67,1132	63,4855
56,23	58,0438	88,8796	70,7409	94,3213	76,1826
63,4855	36,2774	72,5548	72,5548	59,8577	67,1132
61,9716	52,6022	79,8103	41,719	58,0438	79,8103

<b>soro 156</b>	<b>soro 158</b>	<b>soro 159</b>	<b>soro 160</b>	<b>soro 162</b>
70,7409	52,6022	54,4161	65,2993	81,6242
72,5548	101,577	77,9964	83,438	94,3213
61,6716	41,719	88,8796	68,9271	79,8103
52,6022	63,4855	68,9271	54,4161	105,204
77,9964	59,8577	61,6716	68,9271	63,4855
85,2519	47,1606	92,5074	67,1132	81,6242
88,8796	56,23	103,391	79,8103	61,6716
63,4855	77,9964	65,2993	85,2519	65,2993
88,8796	63,4855	65,2993	96,1351	88,8796
59,8577	61,6716	54,4161	123,343	67,1132
58,0438	94,3213	83,438	92,5074	83,438
92,5074	39,9051	83,438	45,3468	136,04
63,4855	65,2993	68,9271	94,3213	99,7629
96,1351	81,6242	81,6242	105,204	56,23
110,646	59,8577	52,6022	72,5548	76,1826
121,529	81,6242	96,1351	88,8796	59,8577
74,3687	68,9271	74,3687	67,1132	76,1826
47,1606	99,7629	85,2519	90,6935	79,8103
90,6935	103,391	70,7409	67,1132	77,9964
67,1132	92,5074	47,1606	48,9745	108,832
67,1132	103,391	58,0438	61,6716	108,832
83,438	81,6242	83,438	110,646	65,2993
79,8103	58,0438	41,719	87,0658	94,3213
61,6716	79,8103	54,4161	61,6716	105,204
97,949	47,1606	77,9964	74,3687	83,438
74,3687	67,1132	117,902	72,5548	56,23
88,8796	48,9745	94,3213	96,1351	63,4855
79,8103	47,1606	70,7409	97,949	76,1826
81,6242	81,6242	103,391	65,2993	70,7409
48,9745	76,1826	87,0658	76,1826	77,9964
81,6242	56,23	72,5548	70,7409	74,3687
119,715	68,9271	77,9964	119,715	54,4161
79,8103	58,0438	81,6242	94,3213	70,7409
72,5548	45,3468	67,1132	130,599	65,2993
101,577	72,5548	110,646	90,6935	67,1132
110,646	63,4855	72,5548	72,5548	67,1132
134,226	56,23	83,438	47,1606	72,5548
58,0438	74,3687	103,391	94,3213	83,438
58,0438	72,5548	81,6242	67,1132	63,4855
61,6716	68,9271	76,1826	68,9271	48,9745
79,8103	54,4161	90,6935	63,4855	39,9051
96,1351	63,4855	54,4161	59,8577	41,719
70,7409	48,9745	107,018	68,9271	61,6716
88,8796	76,1826	68,9271	58,0438	52,6022
72,5548	58,0438	56,23	88,8796	68,9271
94,3213	52,6022	67,1132	90,6935	103,391
87,0658	101,577	105,204	88,8786	65,2993
114,274	81,6242	97,949	83,438	72,5548
72,5548	83,438	96,1351	56,23	74,3687

61,6716	72,5548	90,6935	68,9271	108,832
67,1132	81,6242	112,46	68,9271	110,646
83,438	77,9964	94,3213	125,157	108,832
97,949	83,438	99,7629	90,6935	79,8103
105,204	65,2993	96,1351	96,1351	99,7629
72,5548	76,1826	74,3687	87,0658	92,5074
56,23	70,7409	68,9271	67,1132	74,3687
63,4855	65,2993	132,413	87,0658	88,8796
63,4855	72,5548	63,4855	85,2519	72,5548
90,6935	48,9745	74,3687	77,9964	85,2519
81,6242	77,9964	61,6716	108,832	92,5074
70,7409	79,8103	90,6935	121,529	85,2519
83,438	96,1351	67,1132	68,9271	72,5548
105,204	107,018	63,4855	58,0438	85,2519
77,9964	63,4855	65,2993	87,0658	79,8103
77,9964	76,1826	81,6242	110,646	107,018
70,7409	65,2993	65,2993	61,6716	68,9271
79,8103	97,949	83,438	87,0658	67,1132
97,949	119,715	105,204	74,3687	70,7409
92,5074	79,8103	85,2519	90,6935	90,6935
79,8103	107,018	81,6242	67,1132	87,0658
79,8103	67,1132	65,2993	76,1826	97,949
90,9635	77,9964	97,949	68,9271	56,23
101,577	70,7409	110,646	107,018	87,0658
68,9271	87,0658	74,3687	83,438	79,8103
90,6935	103,391	99,7629	50,7884	105,204
81,6242	50,7884	99,7629	70,7409	63,4855
90,6935	67,1132	99,7629	77,9964	76,1826
88,8796	92,5074	137,854	87,0658	103,391
70,7409	58,0438	94,3213	94,3213	50,7884
68,9271	88,8796	61,6716	81,6242	81,6242
83,438	76,1826	97,949	70,7409	99,7629
74,3687	77,9964	45,3468	81,6242	81,6242
112,46	56,23	70,7409	83,438	67,1132
114,274	70,7409	85,2519	105,204	87,0658
108,832	68,9271	112,46	58,0438	90,6935
85,2519	72,5548	90,6935	85,2519	77,9964
79,8103	88,8796	99,7629	68,9271	65,2993
74,3687	87,0658	59,8577	77,9964	72,5548
68,9271	56,23	94,3213	72,5548	74,3687
67,1132	99,7629	72,5548	59,8577	85,2519